

**DIE DIAGNOSE DER LISTERIENENZEPHALITIS
BEI HAUSWIEDERKÄUERN MITTELS
BAKTERIOLOGISCHER , HISTOLOGISCHER
UND IMMUNOHISTOCHEMISCHER METHODEN**

ROBERT GAYER

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt
Aulendorf

Leiter: Ltd. Reg. Vet. Dir. Dr. B. Müller

vorgelegt über das
Institut für Tierpathologie der Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

Die Diagnose der Listerienenzephalitis bei
Hauswiederkäuern mittels bakteriologischer,
histologischer und immunohistochemischer Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Robert Gayer

Altshausen 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse _____

Referent: _____ Prof. Dr. E. Dahme _____

Korreferent: _____ Prof. Dr. W. Klee _____

Tag der Promotion: _____ 29. Juli 1988 _____

Meiner lieben Frau

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Geschichtliches	2
2.2 Ätiologie	3
2.3 Vorkommen	6
2.4 Bedeutung	7
2.4.1 Allgemeines	7
2.4.2 Bedeutung bei Wiederkäuern	7
2.4.3 Bedeutung für den Menschen	10
2.5 Serologie	11
2.6 Pathogenität	14
2.7 Listerieninfektionen bei Wiederkäuern	17
2.7.1 Zerebrale Form	18
2.7.1.1 Infektionsquellen	19
2.7.1.2 Pathogenese	22
2.7.1.3 Inkubationszeit	24
2.7.1.4 Klinische Symptomatik	25
2.7.1.5 Krankheitsdauer	26
2.7.2 Metrogene Form	27
2.7.3 Septikämische Form	28
2.7.4 Atypische Formen	29
2.8 Krankheitsverlauf beim Menschen	30
2.9 Jahreszeitliches Auftreten	33
2.10 Histopathologie	34
2.10.1 Topographie	34
2.10.2 Charakter der entzündlichen Prozesse	36
2.10.3 Mikroskopischer Nachweis der Bakterien	39
2.10.4 Bewertung der histologischen Diagnose	40
2.11 Immunhistologie	42
3. Eigene Untersuchungen	43
3.1 Material und Methoden	43

	Seite
3.1.1	Histologie 43
3.1.1.1	Routinehistologie - H.E.-Färbung 43
3.1.1.2	Histologie - Nissl-Färbung 44
3.1.2	Bakteriologie 46
3.1.2.1	Isolierung 46
3.1.2.2	Bestätigung verdächtiger Isolate 47
3.1.2.3	Listeria-Referenzstämme 49
3.1.3	Immunhistologie 50
3.1.3.1	Listeria monocytogenes-Antiseren von Kaninchen 50
3.1.3.1.1	Herstellung 50
3.1.3.1.2	Antikörpertiterbestimmung 51
3.1.3.1.3	Ergebnisse 52
3.1.3.1.4	Spezifitätskontrollen 53
3.1.3.1.5	Beseitigung von Kreuzreaktionen 54
3.1.3.1.6	Anwendung der Antiseren 55
3.1.3.2	Immunohistochemische Färbetechniken 56
3.1.3.2.1	Indirekte Immunofluoreszenz 57
3.1.3.2.2	Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik 58
3.1.3.2.3	Avidin-Biotin-Technik (ABC-Peroxidase-Technik) 59
3.1.3.3	Listeria-Reinkultur-Ausstriche 60
3.1.3.4	Abklatschpräparate 61
3.1.3.5	Gefrierschnitte 61
3.1.3.6	Kryostatschnitte 62
3.1.3.7	Paraffinschnitte 63
3.1.3.8	Immunhistologische Kontrollen 64
3.1.4	Anamnese 64
3.1.4.1	pH-Wert-Messung in Silageproben 64
3.1.5	Lösungen für die Immunhistologie 65
3.1.6	Lösungen für die Nissl-Färbung 66
3.1.7	Medien und Reagenzien für die Bakteriologie 67
3.1.8	Chemikalien und Bezugsquellen 70
3.2	Ergebnisse 72
3.2.1	Histologie 72
3.2.1.1	Histologische Befunde 72

3.2.1.2	Histopathologische Auswertung mittels Nisslfärbung	73
3.2.1.3	Mikroskopischer Nachweis der Bakterien	78
3.2.1.4	Monatliche Verteilung der Fälle	80
3.2.2	Bakteriologie	81
3.2.3	Vergleich zwischen Histologie und Bakteriologie	86
3.2.4	Immunhistologie	88
3.2.4.1	Listeria-Reinkulturausstriche	88
3.2.4.2	Abklatschpräparate	89
3.2.4.3	Gefrierschnitte nach Formalin-Fixierung	91
3.2.4.4	Kryostatschnitte an frischem, unfixiertem Material	92
3.2.4.5	Paraffinschnitte	100
3.2.5	Vergleich zwischen Histologie, Bakteriologie, Immunhistologie	101
3.2.6	Anamnese	102
4.	Diskussion	111
4.1	Histopathologische Befunde	111
4.2	Bakteriologische Befunde	112
4.3	Immunhistologie	115
4.3.1	Abklatschpräparate	115
4.3.2	Gefrierschnitte nach Formalin-Fixierung	116
4.3.3	Kryostatschnitte an frischem, unfixiertem Hirnmaterial	116
4.3.4	Paraffinschnitte	118
4.3.5	Anamnese	119
4.3.6	Schlußfolgerungen	120
5.	Zusammenfassung/Summary	123
6.	Immunhistologische Abbildungen	126
7.	Literaturverzeichnis	128

1. Einleitung

Listeriosen, die bei sehr vielen Säugetieren, Vögeln und auch beim Menschen vorkommen, waren in den letzten 30 Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In Form der Listerienenzephalitis werden Erkrankungen unter den Haustieren am häufigsten bei Wiederkäuern beobachtet. Bei den im Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf diagnostizierten Fällen steht das Rind an erster Stelle. Seit etwa 10 Jahren wurde bei dieser Tierart eine deutliche Zunahme gegenüber früheren Jahren festgestellt.

Die Diagnosesicherung bereitet vielfach Schwierigkeiten. Histopathologische Befunde erlauben bei Wiederkäuern im Zusammenhang mit dem klinischen Bild zwar eine Wahrscheinlichkeitsdiagnose, beweisend ist jedoch allein der Erregernachweis. Auch die Aussagekraft serologischer Methoden ist beschränkt.

Der kulturelle Nachweis der Erreger ist häufig erst nach zeitraubender Kälteanreicherung möglich. In letzter Zeit wurden aber immunhistologische Methoden mit der Immunofluoreszenz- und Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP) -Technik für die rasche Identifizierung von Listerien empfohlen.

Die mir gestellte Aufgabe besteht darin, die für eine rasche Bearbeitung geeignetste diagnostische Methode herauszufinden und zu prüfen, inwiefern dadurch die routinemäßige Labordiagnostik verbessert werden kann. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit die in der Zeit vom 01.12.1986 bis 30.11.1987 eingesandten Gehirne auf bakteriologischem, histologischem und immunohistochemischem Wege untersucht und die Ergebnisse anamnestischen Befunden gegenübergestellt werden.



2. Literaturübersicht

2.1 Geschichtliches

Die Engländer MURRAY, WEBB und SWANN konnten im Jahre 1926 in Cambridge bei einer enzootischen Erkrankung von Kaninchen und Meerschweinchen zum ersten Mal den Erreger der Listeriose isolieren. Er wurde damals als *Bacterium monocytogenes* bezeichnet. Fast gleichzeitig fand PIRIE 1927 in Südafrika bei Wüstenmäusen denselben Keim und nannte ihn zu Ehren von Lord Lister *Listerella hepatolytica*. Nachdem die Identität der beiden Keime feststand, wurde die Bakterienart *Listerella monocytogenes* genannt. 1940 erfolgte dann die Umbenennung in *Listeria monocytogenes* (PIRIE, 1940).

In Neuseeland beschrieb GILL 1931 zum ersten Mal eine durch *Listeria monocytogenes* verursachte Meningoenzephalitis bei Schafen, die er nach den klinischen Symptomen als "Circling disease" bezeichnete (GILL, 1931).

In Deutschland wurde die Krankheit beim Schaf erstmals 1940 von PALLASKE festgestellt (PALLASKE, 1940).

Beim Rind schilderte MATHEWS 1928 in Amerika als erster die zerebrale Form der Listeriose bei Mastkälbern, die ausgeprägte zentralnervöse Störungen und deutliche histopathologische Veränderungen im Gehirn aufwiesen. Allerdings konnten die Erreger nicht nachgewiesen werden.

1934 gelang JONES und LITTLE in New Jersey (Nordamerika) bei Rindern mit Listerienenzephalitis zum ersten Mal der Erregernachweis (FLAMM, 1957).

In Europa wurde die zerebrale Listeriose des Rindes erstmals in den Niederlanden 1951 beobachtet (VAN DER SCHAAFF et al., 1951).

Sowohl im Ausland als auch in Deutschland blieb es bis in die Zeit nach dem zweiten Weltkrieg ziemlich ruhig um diese Krankheit. Erst in den fünfziger Jahren nahmen die Berichte über gesicherte Fälle als auch die Kenntnisse über die Listeriose allmählich zu (TRAIN, 1959; VON DER AA, 1963; GRAY und KILLINGER, 1966; DEDIE und BOSTEDT, 1985). Listeriosefälle bei Rindern in Deutschland wurden in den fünfziger Jahren zwar vereinzelt beobachtet (FLAMM, 1957; WINKENWERDER, 1967), die erste histologisch und bakteriologisch nachgewiesene Listerienenzephalitis beim Rind soll jedoch in der Bundesrepublik Deutschland erst 1967 von WEIS beschrieben worden sein (WEIS, 1967, zit. n. KNÖSEL et al., 1968). LINSERT (1959) und WINKENWERDER (1967) stellten ebenfalls fest, daß die zerebrale Verlaufsform beim Rind vorher in Deutschland noch nie diagnostiziert wurde und auch BRÄUER gibt in seiner Schrifttumsübersicht 1966 keinen Hinweis auf eine frühere Beschreibung dieser Erkrankung in Deutschland.

Die ersten Berichte über Listeriose bei der Ziege kamen 1940 aus den USA von KING und OLAFSON. In der BRD berichtete GALL 1962 erstmals über die Gehirnlisteriose bei Ziegen.

2.2 Ätiologie

Der Gattung *L i s t e r i a* gehören die Arten *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* an (EMMERLING et al., 1986, SEELIGER, 1987 a). *L. grayi* und *L. murrayi*

sind aber wahrscheinlich Angehörige einer anderen Gattung (SCHRETTENBRUNNER et al., 1986).

Ausführliche Beschreibungen über die Eigenschaften des Erregers der Listeriose finden sich bei SEELIGER (1961 und 1987a) und AMTSBERG (1980):

Listeria monocytogenes (L. m.) ist ein grampositives, nicht sporenbildendes, kokkoides Bakterium mit einer Länge von 0,5 - 2 μm und einem Durchmesser von 0,4 - 0,5 μm . Die Stäbchen erscheinen an den Enden abgerundet, manche sind leicht gekrümmt. Gelegentlich tritt auch Polymorphismus auf. Ein morphologisch und diagnostisch wichtiges Merkmal ist die aktive Beweglichkeit durch peritriche Begeißelung, die zwischen 20° und 32° C am intensivsten zu beobachten ist.

L. m. kann innerhalb einer breiten Temperaturspanne von + 3° C bis + 45° C wachsen, wobei die optimale Wachstumstemperatur zwischen 30° und 37° C liegt. Das Wachstum erfolgt aerob bis mikroaerophil. Unter strikt anaeroben Bedingungen gedeiht *L. m.* nur kümmerlich. Der Keim ist in seinen Ansprüchen an Nährböden sehr bescheiden und wächst auf den gebräuchlichen festen, flüssigen und halbfesten Nährmedien. Durch Zusatz von Blut, Serum oder Glucose kann das Wachstum gefördert werden. Bei 36° C bilden sich innerhalb von 24 - 48 h kleine, glattrandige, durchsichtige, tautropfenähnliche Kolonien, die später gräulich erscheinen. Auf Blutagar tritt bei *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* β -Hämolyse auf; bei *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und *L. murrayi* wird keine Hämolyse beobachtet (siehe Tab. 4).

Die Identifizierung von *Listeria*-verdächtigen Kolonien aus Mischkulturen erfolgt am besten durch die Schräg- durchleuchtung farbloser Plattenkulturen im Winkel von 45° nach HENRY (1933). Dabei zeigen *L. m.*-Kolonien eine charakteristische blaugrüne oder blaugraue Farbe mit feiner Textur (OBIGER und SCHÖNBERG, 1973; AMTSBERG, 1980).

Biochemisch sind *Listerien* wenig aktiv. Einige wichtige Merkmale sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 Merkmale von *Listeria* spp.
(nach PÖTEL et al., 1982)

	Spaltung von										
	Glukose	Rhamnose	Mannit	Xylose	Salizin	Nitratreduktion	H ₂ S (Kligler)	Äskulin-Hydrolyse	Beweglichkeit	Katalase	Hämolyse
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	¹	-	²	+	-	-	+	+	+	β
<i>Listeria grayi</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Listeria murrayi</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>Listeria innocua</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-

1: Serovar 5:negativ

Serovar 5 = *L. ivanovii*

2: Serovar 5:positiv

Listerien können in einem pH-Bereich zwischen 5,6 und 9,6 wachsen, erst ab pH 4,8 und niedriger erfolgt keine Vermehrung mehr (AMTSBERG, 1980; SEELIGER, 1987 c).

2.3 Vorkommen

Seit der ersten Feststellung von L. m. 1926 wurden Listeriosen neben dem Menschen inzwischen bei mehr als 43 verschiedenen Säugetier- und 22 Vogelarten beschrieben. Außer bei Warmblütern werden Infektionen auch bei verschiedenen Kaltblütern und Arthropoden beobachtet (AMTSBERG, 1979; SEELLIGER, 1987 b).

Listerien sind weltweit und ubiquitär verbreitete Bakterien, die auf Pflanzen und im Erdboden ein saprophytisches Dasein führen und in nahezu allen klimatischen und geographischen Regionen vorkommen. Die Bakterien konnten fast überall in der Umwelt (Boden, Pflanzen, Wasser, Abwasser usw.) isoliert werden. Auch im Kot gesunder Haus- und Wildtiere werden sie regelmäßig angetroffen. Gegen Umwelteinflüsse wie Kälte, Hitze, Trockenheit und hohe Kochsalzkonzentrationen erweisen sich Listerien als sehr widerstandsfähig. In Listerien-kontaminierten Materialien wie Futter, Einstreu, Kot, Harn, Erdboden, Weiden, Stallwänden und Wasser, ist L. m. mindestens mehrere Wochen, in den meisten Fällen jedoch über Monate und sogar Jahre überlebensfähig (AMTSBERG, 1980).

Das ubiquitäre Vorkommen der Erreger bestätigte sich auch an eigenen Untersuchungen von 24 Hackfleischproben aus dem Einzelhandel. Die Proben wurden nach dem unter 3.1.2.1 genannten Verfahren bakteriologisch untersucht. Insgesamt konnten dabei 14mal Listerien isoliert werden, wovon 8 Proben L. monocytogenes und 6 Proben L. innocua enthielten (eigene unveröffentlichte Untersuchungen).

Aufgrund der genannten Eigenschaften werden Listerien als geophile, fakultativ pathogene Bakterien bezeichnet (AMISBERG, 1979; SEELLIGER, 1987 a).

2.4 Bedeutung

2.4.1 Allgemeines

Listeriosen, die bei vielen Tierarten sowie beim Menschen weltweit festgestellt werden, zählten noch vor einiger Zeit zu den seltenen und nur sporadisch auftretenden Infektionskrankheiten. In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Berichte über stärkere Zunahmen von Listeriosefällen sowohl bei Haus- und Wildtieren als auch beim Menschen (WEIS, 1973; GROTTKER, 1985; EMMERLING et al., 1986; NICOLAI-SCHOLTEN et al., 1985; RALOVICH, 1987; SKOVGAARD, 1987 b).

So soll die Zahl klinischer Fälle bei Rindern in Deutschland zwischen 1970 und 1980 um das Fünffache, bei Schafen um das Zweifache gestiegen sein (SCHÖNBERG, 1986, zit. n. SKOVGAARD, 1987 b). Auch in Großbritannien wird seit 1965 eine ansteigende Tendenz, besonders beim Schaf, beobachtet (ANONYM, 1983; BARLOW und MC GORUM, 1985; LOW und LINKLATER, 1985).

In den meisten europäischen Ländern nehmen Listeriosen seit etwa 1970 einen bedeutenden Platz in der Tier- wie Humanpathologie ein. Lediglich in den Niederlanden und in Ungarn wurde über eine deutliche Abnahme einschlägiger Erkrankungen berichtet (RALOVICH, 1987).

2.4.2 Bedeutung bei Wiederkäuern

In der Bundesrepublik Deutschland besteht aufgrund der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 29.04.1970 für die Listeriose Meldepflicht.

Abb. 1 zeigt die seither am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf diagnostizierten Fälle von Listerienenzephalitis bei Rind und Schaf. Demnach wurde ein starker Anstieg der Erkrankungen seit 1979, besonders beim Rind, verzeichnet. Während von 1970 bis 1979 Listeriose bei Rind und Schaf nur in Einzelfällen auftrat, nahmen die Zahlen beim Rind danach deutlich zu. Beim Schaf dagegen verlief der Anstieg eher langsam (Tab. 2, Abb. 1).

Tabelle 2

Am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt
Aulendorf diagnostizierte Fälle zerebraler Listeriose
bei Rind und Schaf

Jahr	Rind	Schaf	Gesamt
1970	1	3	4
1971	1	-	1
1972	-	4	4
1973	1	2	3
1974	8	6	14
1975	2	4	6
1976	2	3	5
1977	1	3	4
1978	8	9	17
1979	22	10	32
1980	30	11	41
1981	31	18	49
1982	45	4	49
1983	87	13	100
1984	50	9	59
1985	33	7	40
1986	76	10	86
1987	55	14	69

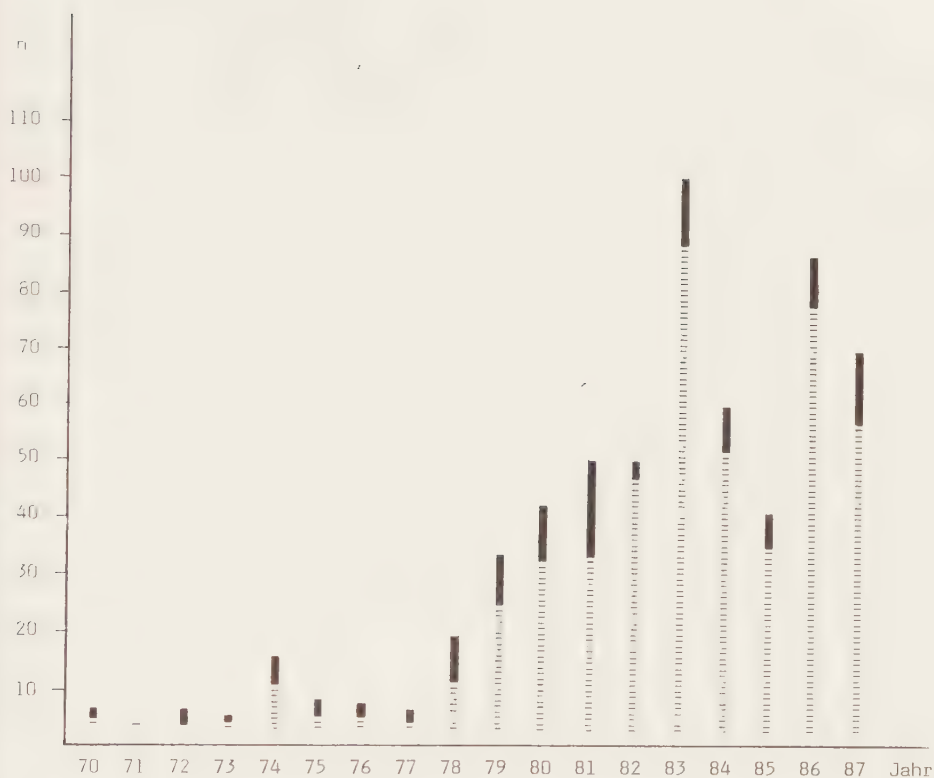


Abb. 1: Am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf in der Zeit von 1970 bis 1987 diagnostizierte Fälle zerebraler Listeriose bei Rind(□) und Schaf(■)

Wegen der Infektionsmöglichkeit für den Menschen ist die Listeriose 1960 in § 32 Abs. 1 Ziff. 21 AB.A zum Fleischbeschaugesetz aufgenommen worden. Das geschlachtete Tier war danach als untauglich zu beurteilen. Inzwischen hat sich die Beurteilung der Listeriose in der Fleischhygienegesetzgebung gewandelt. Aufgrund der Fleischhygieneverordnung vom 30.10.1986 (BGBl. I, S. 1678 - 1722) sind nun bei Vorliegen von Listeriose der Tierkörper (nach Kap. IV, Ziff. 6.5) als bedingt tauglich, die Organe (Kap. IV, Ziff. 10.4) als untauglich zu beurteilen, sofern nicht andere Bedingungen vorliegen, die die Genußtauglichkeit einschränken. Die baden-württembergische Tierseuchenkasse gewährt aufgrund von § 10 Abs. 1, § 12 Abs. 1 und § 24 Abs. 2 des Ausführungsgesetzes zum Viehseuchengesetz (AGViehsG) vom 06.11.1973 (GBI. S. 397) Beihilfen für Rinder und Schafe, die an Listeriose verendet sind oder mit Einwilligung des Staatlichen Veterinäramtes getötet wurden (Beihilfesatzung der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg in der Fassung vom 08.09.1980).

2.4.3 Bedeutung für den Menschen

Nach § 3 des Bundesseuchengesetzes vom 01.01.1980 unterliegt auch die Listeriose des Menschen der Meldepflicht. Sie besitzt auch beim Menschen erhebliche Bedeutung (SEELLIGER, 1982). Seit 1950 stieg die Zahl nachgewiesener Fälle stetig an, 1984 zählte man weltweit schon über 10 000 Fälle. Schon 1968 betonte POTEL die große Bedeutung der Listeriose für den öffentlichen Gesundheitsdienst, nachdem in der DDR 1966 299 Erkrankungsfälle, davon 119 mit tödlichem Ausgang, gezählt wurden. Heute stehen Listerienenerkrankungen nach der kongenitalen Toxoplasmose an zweiter Stelle der angeborenen Infektionen (SCHRETTENBRUNNER et al., 1986).

Als mögliche Infektionsquellen für den Menschen kommen trotz ubiquitärer Verbreitung der Erreger in der Umwelt vor allem sekundär kontaminierte Nahrungsmittel, insbesondere Lebensmittel tierischer Herkunft, in Betracht. Pathogene und apathogene Listerien sind weit verbreitet auf bestimmten Käsesorten, in Rohwurst, tierischen und menschlichen Fäkalien und im Abwasser nachgewiesen worden (SEELIGER, 1987 c). Auch kontaminierte pflanzliche Produkte können bei Rohverzehr eine Rolle spielen. Bei drei Epidemien in Kanada und den USA konnten in einem Fall verunreinigter Weißkrautsalat (SCHLECH et al., 1983), in einem anderen Fall pasteurisierte Milch (FLEMING et al., 1985) und im dritten Fall ein Mexikanischer Weichkäse (ANONYM, 1985) als Ursache ermittelt werden. Das Weißkraut stammte von Feldern, die mit Dung listerieninfizierter Schafe gedüngt worden waren. Es war im Herbst geerntet und bis ins Frühjahr hinein kühl gelagert worden.

Neben vermehrtem Auftreten von Listeriose in Österreich (HIRSCHL et al., 1980) wurde auch in der Bundesrepublik Deutschland über einen Ausbruch berichtet, bei dem von 24 Erkrankten 5 Menschen starben (NICOLAI-SCHOLTEN et al., 1985). Über plötzliche Häufungen von Listeriosefällen in der Schweiz zwischen 1983 und 1987 wurde vor kurzem berichtet (BILLE u. GLAUSER, 1988). Es traten 61 Fälle von Schwangerschaftslisteriose und 61 Fälle von Erwachsenenlisteriose auf, wobei 33 Personen starben. Als Ursache der Ausbrüche machte man eine Sorte infizierten französischen Weichkäses verantwortlich.

2.5 Serologie

Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen im Aufbau der Zellwand- oder O-Antigene und der Geißel- oder H-Antigene lassen sich serologisch innerhalb der Gattung *Listeria* bei den einzelnen Arten verschiedene Serotypen unterscheiden (SEELIGER, 1987 a, Tab. 3).

Tabelle 3 (nach SEELIGER, 1967 a)

Serovare des Genus Listeria (L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. welshimeri,
L. grayi und L. murrayi)

PATERSONS Schema - modifiziert und erweitert von SEELIGER und DONKER-VOET

L. monocytogenes*	1/2a	I	II	(III) xxx	O-Antigen-Faktoren		H-Antigen-Faktoren
	1/2b	I	II	(III)			A B
	1/2c	I	II	(III)			A B C
	3 a	II	(III)	IV			B D
	3 b	II	(III)	IV			A B
	3 c	II	(III)	IV		(XII XIII)	A B C
	4 a		(III)	(V)	VII IX	(XII XIII)	B D
	4 a b		(III)	V	VI VII IX X		A B C
	4 b		(III)	V	VI		A B C
	4 c		(III)	V	VII		A B C
	4 d		(III)	(V)	VI VIII		A B C
	4 e		(III)	V	VI (VIII) (IX)		A B C
	7		(III)			XII XIII	A B C
L. ivanovii	5		(III)	(V)	VI (VII) X		A B C
L. innocua 6 a("4 f")			(III)	V	(VI)(VII)	(IX)	A B C
6 b("4 g")xx			(III)	(V)	(VI)(VII)	IX X XI	A B C
L. grayi			(III)			XII XIV	L
L. murrayi			(III)			XII XIV	F

* L. seeligeri kann serologisch nicht von L. monocytogenes unterschieden werden
xx
L. welshimeri kann serologisch nicht von L. innocua unterschieden werden 6 b
xxx () = nicht immer vorhanden

Zwischen L. m. und anderen Bakterienarten, wie Streptokokken, Staphylokokken, Corynebakterien, Enterokokken und Coliformen, bestehen O-Antigengemeinschaften, die bei serologischen Untersuchungen zu Kreuzreaktionen führen können. Zwischen H-Antigenen konnten solche Kreuzreaktionen nicht ermittelt werden (SEELIGER, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; AMTSBERG, 1980).

In den fünfziger bis Anfang der sechziger Jahre überwog in Deutschland der Serotyp 1/2 (LINSERT, 1957; VON DER AA, 1961 und 1963; SEELIGER, 1961; DEDEK, 1967). Während dieser in der DDR nach wie vor im Vordergrund steht, ist seit 1960 im Westen Deutschlands diese Serovarietät immer mehr vom Typ 4 b verdrängt worden, welcher heute zu dem in der BRD am häufigsten isolierten Serotyp gehört (GRAY und KILLINGER, 1966; BEHRENS und KRÜGER, 1969; SEELIGER und EMMERLING, 1970; SEELIGER und HÖHNE, 1979). Ausnahmsweise können bei einem Tier gleichzeitig zwei verschiedene Serotypen isoliert werden (BEHRENS und KRÜGER, 1969).

Als empfindlichstes Verfahren zur Untersuchung serologischer Antikörpertiter erwies sich die Röhrenagglutination (= Langsamagglutination) (SEELIGER, 1961). Andere brauchbare serologische Verfahren wie Komplementbindungsreaktion, Wachstumsprobe, Agglutinations-Immobilisierungstest, Antigen-Fixationstest oder indirekte Hämagglutination können bei zweifelhaften Titern die Aussagekraft erhöhen (SCHÄFER, 1976; AMTSBERG, 1980).

Im Rahmen der Listeriosediagnostik besitzen serologische Methoden nur eine sehr begrenzte Aussagekraft. Eine einmalige Untersuchung des Serums von Einzeltieren gestattet kaum eine diagnostische Aussage (DEDIE, 1955; LINSERT, 1956; SEELIGER, 1961). Die diagnostische Spezifität

serologischer Reaktionen wird außerdem durch die o. g. Kreuzreaktivität gemindert (LEHNERT, 1964; SEELIGER und EMMERLING, 1970).

Bei akuter Listeriose steigen die Antikörper nicht früh genug signifikant an, so daß erkrankte Tiere i. A. keine höheren Titer aufweisen als gesunde. Lediglich in protrahierten oder chronischen Fällen erlangen Titerverlaufsuntersuchungen eine gewisse diagnostische Bedeutung, wenn dabei ein Anstieg um das Zweifache beobachtet wird (VON DER AA, 1961; SEELIGER, 1987 b). Allgemein gelten bei der Langsamagglutination Titer von $1:160^{++}$ als verdächtig und von $1:320^{++}$ als positiv (LINSERT, 1956; VON DER AA, 1961; SEELIGER und EMMERLING, 1970; SCHÄFER, 1976; AMTSBERG, 1979). Dennoch bleibt die Interpretation serologischer Ergebnisse schwierig, denn auch gesunde Rinder und Schafe weisen häufig hohe Antikörpertiter gegen L. m. auf (LINSERT, 1956). Andererseits findet man bei bakteriologisch gesicherten Listeriosefällen vielfach nur niedrige oder negative Titer (LEHNERT, 1964; AMTSBERG, 1979). Die Agglutinationstiter gegen Listerien erhöhen sich mit zunehmendem Lebensalter der Tiere (WINKENWERDER und ABDALLAH, 1967). Doch das Auftreten von Serumantikörpern hängt in erster Linie vom Infektionsweg ab. Bei rein neurogener Erregerausbreitung ist zunächst keine systemische Reaktion des Immunsystems zu erwarten (DAHME, 1988). Eine Listerienenzephalitis kann auch dann auftreten, wenn bereits Antikörper gegen L. m. vorhanden sind (VON DER AA, 1961).

2.6 Pathogenität

Für die Virulenz von Listerienarten spielt die Produktion von Hämolyisin eine wichtige Rolle (Tab. 4).

Tabelle 4 Pathogene Rolle der verschiedenen Listerienarten (nach EMMERLING et al., 1986)

Listerienart	Pathogenität	Hämolyse
<i>L. monocytogenes</i>	++	+
<i>L. ivanovii</i>	+	++
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-

Als einzige für Tier und Mensch pathogen eingestuft Spezies von *Listeria* werden *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* angesehen (ROCCOURT, 1987; SEELIGER, 1987 a). Vor kurzem wurde jedoch beim Menschen eine Meningitis auch durch *L. seeligeri* beschrieben (ROCCOURT et al., 1986). *L. monocytogenes* zeigt eine gewisse Affinität zu Gehirn und Hirnhäuten, daneben können auch Leber und Milz geschädigt werden. Dagegen scheint *L. ivanovii* bevorzugt Leber und Milz und erst an zweiter Stelle das Zentralnervensystem zu befallen. *L. ivanovii* wird nur sehr selten gefunden und kann gleichfalls wie *L. m.* auch Aborte bei Rind, Schaf und Ziege verursachen (SEELIGER, 1987 b; ROCCOURT, 1987).

L. innocua wird unter experimentellen Bedingungen allgemein als apathogen angesehen (SEELIGER, 1981 und 1984). Dennoch gelang es PATOCKA und Mitarbeiter (1979) nach intrazerebraler Inokulation, bei Saugmäusen eine nicht-eitrige, meistens periventrikulär lokalisierte Enzephalitis hervorzurufen. Die Vermehrung der inokulierten

Listeria innocua-Zellen war morphologisch wie bakterio-
logisch nachweisbar.

Obwohl es zwischen einzelnen Stämmen von *L. m.* deut-
liche Virulenzunterschiede gibt (EMMELRING et al., 1986),
hängen die pathogenen Eigenschaften von *L. m.* weniger
von der Virulenz als von Wirtsgegebenheiten ab
(SCHRETTENBRUNNER et al., 1986). Der Serotyp spielt
für die klinische Manifestation keine Rolle (FLAMM, 1957;
HOOD, 1975). Dagegen bewirken hohes Alter, Gravidität
und Immunsuppression eine erhöhte Anfälligkeit für
Listerioseerkrankungen sowohl beim Tier (LINSERT, 1959;
VON DER AA, 1963; MAYER und SIENG, 1975; WATKINS, 1985)
als auch beim Menschen (SCHRETTENBRUNNER et al., 1986;
SEELIGER, 1987 c). Weitere prädisponierende Faktoren
beim Tier sind eiweißreiche Fütterung (URBANECK und
LIPPMANN, 1961; JAKOB, 1967 b), Mangelzustände (JAKOB,
1963; WUILLERET et al., 1969), radikale Futterumstellungen
(FLAMM, 1957; LINSERT, 1959; AMTSBERG, 1979), andere
bakterielle, virale oder parasitäre Erkrankungen
(MAYER und SIENG, 1975; AMTSBERG, 1979) sowie klima-
tische und witterungsbedingte Einflüsse (URBANECK und
LIPPMANN, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; WUILLERET
et al., 1969).

Eine gewisse Bedeutung in der Pathogenität wurde dem
Serumeisenspiegel beigemessen: In Organen eisenvor-
behandelter Tiere vermehren sich *Listerien* stärker als
bei unbehandelten. Im Verlaufe der *L. m.*-Infektion
nimmt der Eisenspiegel ab. Bei Silagefütterung wurden
durchweg höhere Serumeisenspiegel gefunden als bei
Heufütterung (SWORD, 1966; BLENDEN und SZATALOVICZ, 1967;
OVERAS, 1974 bei AMTSBERG, 1980).

Listerieninfektionen bei Wiederkäuern

Listeriosen treten gewöhnlich in drei klinisch verschiedenen Verlaufsformen auf, nämlich als

1. zerebrale Form,
2. metrogene Form und
3. septikämische Form.

Daneben kommen gelegentlich atypische Manifestationen vor (AMTSBERG, 1980).

Das Auftreten der verschiedenen klinischen Erscheinungsbilder soll vom Alter der Tiere und der allgemeinen Resistenzlage des Organismus abhängen (FLAMM, 1957; MATTHIAS, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966). In der BRD steht allgemein die zerebrale Listeriose bei Wiederkäuern im Vordergrund, während metrogene und septikämische Fälle in der Minderzahl sind (LINSERT, 1959; MATTHIAS, 1961; MAYER und STENG, 1975; DIJKSTRA, 1987).

So betrug im Tiergesundheitsamt Hannover während eines Untersuchungszeitraumes von 13 Jahren der Anteil der an zerebraler Listeriose erkrankten Schafe 98,5 %, wohingegen die metrogene Verlaufsform nur einen Prozentsatz von 0,5 % und die septikämische Form von 1,0 % ausmachten (BÜNING, 1975).

Beim Rind tritt die Listeriose meist sporadisch auf,

nur ausnahmsweise können mehrere Tiere einer Herde betroffen sein (JONES und LITTLE, 1934; BRÄUER, 1966; STÜBER, 1985). In Schafherden dagegen erkranken vielfach mehrere Tiere gleichzeitig (LINSERT, 1957 und 1959; URBANECK und LIPPMANN, 1961; DEDIE und BOSTEDT, 1985).

2.1.1 Zerebrale Form

Die Gehirnlisteriose kommt bei allen Rassen, Geschlechts- und Altersgruppen vor (URBANECK und LIPPMANN, 1961; DEDIE und BOSTEDT, 1985; DIJKSTRA, 1987), wobei Kälber und Lämmer jedoch seltener erkranken (IWANOW, 1962; GRAY und KILLINGER, 1966; BEHRENS und KRÜGER, 1969). Bei Tieren, deren Vormagenentwicklung noch nicht abgeschlossen ist, wird die Listerienenzephalitis allerdings nicht beobachtet, da diese ebenso wie Monogastrier anscheinend weniger empfänglich für diese Verlaufsform sind (vgl. 2.7.3) (GRAY und KILLINGER, 1966; BIENFEL et al., 1969). Schafe und Ziegen erkranken zumeist akut, bei Rindern verläuft die Erkrankung eher subakut, bei Lämmern und Kälbern auch perakut (TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; BRÄUER, 1966; GRAY und KILLINGER, 1966; MAYER und SIENG, 1975).

Neben nichtträchtigen Tieren können trächtige ebenso an zerebraler Listeriose erkranken, ohne Störungen der Trächtigkeit zu zeigen (URBANECK und LIPPMANN, 1961).

2.7.1.1 Infektionsquellen

Da Listerien als ubiquitär vorkommende Saprophyten anzusehen sind, ergeben sich daraus zahlreiche Infektionsmöglichkeiten. Für Wiederkäuer stellt jedoch kontaminiertes Futter, besonders Silage von mangelhafter Qualität, die wichtigste Infektionsquelle dar (VON DER AA, 1961 und 1963; KRÜGER, 1963; LEHNERT, 1964; WEIS, 1967; WACHENDÖRFER und ZIRPEL, 1976).

Die Bedeutung der Silagefütterung in Zusammenhang mit dem Auftreten von Listeriose bei Rind und Schaf wurde schon frühzeitig erkannt (OLAFSON, 1940).

Dieser Zusammenhang konnte, besonders für die zerebrale Verlaufsform, immer wieder bestätigt werden und gilt heute als gesichert (VON DER AA, 1961 und 1963; URBANECK und LIPPMANN, 1961; IWANOW, 1962; KRÜGER, 1963; LEHNERT, 1964; DIJKSTRA, 1965 und 1987; WEIS, 1965, 1967 und 1973; GRAY und KILLINGER, 1966; WINKENWERDER, 1967; EL GABBAR MOHAMMED, 1969; KHAN et al., 1977; FATZER und STECK, 1974; AMTSBERG, 1979 und 1980; GROTTKER, 1985; SKOVGAARD, 1987 a

L. m. konnte bisher aus Mais-, Gras-, Roggen-, Hafer-, Leguminosen-, nicht dagegen aus Rübenblattsilage isoliert werden (KRÜGER, 1963; LEHNERT, 1964; WEIS, 1967; EL GABBAR MOHAMMED, 1969). Gut gesäuerte Silage sollte einen pH-Wert von 3,7 bis 4,2 aufweisen (VON DER AA, 1963; GROSS und RIEBE, 1974; SKOVGAARD, 1987 a). Die kritische Schwelle von pH 4,8 für L. m. wird jedoch in den meisten Fällen, besonders in den Rand- und Oberflächenschichten der Silage, überschritten, so daß sich Listerien hier anreichern können (KRÜGER, 1963;

LEHNERT, 1964; WINKENWERDER, 1967; EL GABBAR MOHAMMED, 1969). Untersuchungen von 1 175 Silierfutterproben in Dänemark ergaben nur bei 35 % der Proben pH-Werte unter 4,2, dagegen lagen 42 % höher als 4,4 (SKOVGAARD, 1987a). WEIS(1965) vertritt die Ansicht, daß Listerien in der Kälte auch pH-Werte von 4,0 bis 5,0 durchaus längere Zeit überleben könnten, und daß damit auch in gut gesäuerter Silage Listerien vorhanden sein können. Die Qualität des Siliergutes entspricht oft nicht den an ein einwandfreies Futtermittel zu stellenden Anforderungen. In Kernsilagen fand KRÜGER (1963) allgemein eine gute bis sehr gute Silagequalität, während diese in Oberflächen- oder Randzonen schlecht bis sehr schlecht war. Bei 25 % der Oberflächensilagen konnten L. m. isoliert werden. In Proben einwandfreien Silierfutters konnte L. m. nicht nachgewiesen werden. Aber im Kern ist mit dem Vorkommen von Listerien ebenso zu rechnen, wenn dieser eine schlechte Qualität aufweist (VON DER AA, 1963; KRÜGER, 1963; LEHNERT, 1964). Listerien bleiben in Silagen über fünf und mehr Jahre lebens- und vermehrungsfähig (WEIS, 1965).

Das Wachstum von Listerien kann durch Sproß- und Schimmelpilze begünstigt werden, indem diese eine Aufzehrung der Milchsäure bewirken (AGANOVIC und FORSEK, 1969). Listerienpositive Silageproben enthielten Sproß- und Schimmelpilze in einem Prozentsatz von 82,3 % (KRÜGER, 1963).

Jedoch auch bei silagefreier Fütterung werden Listerioseerkrankungen beobachtet (WEIS, 1975 b; HOFMANN, 1981; FENSTERBANK et al., 1984). In diesen Fällen kommt hauptsächlich kontaminiertes Grünfutter als Infektionsquelle in Frage (WEIS, 1973 und 1975 b). Welches, ausgebleichtes oder verfaultes Gras erwies sich in hohem Maße als listerienhaltig. Dabei spielt die Verschmutzung mit

Erde eine wesentliche Rolle. Während in Bodenproben landwirtschaftlich genutzter Felder und Wiesen die Isolationsrate von *L. m.* nur gering war (8 - 12 %), konnten in oberflächlichen Bodenschichten unkultivierter Felder und Waldwiesen sehr häufig (51,4 %) Listerien nachgewiesen werden (WEIS, 1975 a; WEIS und SEELIGER, 1975).

Auch die Rolle symptomloser Träger bei der Übertragung der Erreger darf nicht unterschätzt werden. In eine Herde von 200 nichtinfizierten Schafen und Ziegen wurden 10 klinisch gesunde Keimträger verbracht und anschließend die Herde isoliert. 70 Tage später traten die ersten Todesfälle durch Listeriose auf (CHALIMBEKOV, 1957). Durch Verfütterung listerienhaltiger Silage kommt es bei zahlreichen Tieren einer Herde (bei Schafen bis zu 100 %) zu klinisch inapparenten Infektionen mit anschließendem Keimträgertum und Ausscheidung des Erregers mit dem Kot (LEHNERT, 1964). Die Erregerausscheidung tritt sowohl bei erkrankten als auch bei klinisch gesunden Tieren auf, wobei in listeriosefreien Beständen der Prozentsatz an Ausscheidern geringer ist als in Listerioseherden (WINKENWERDER, 1967; WEIS, 1975 b; DIJKSTRA, 1965 und 1987; RALOVICH, 1987). Wildtiere sind ebenfalls häufig Träger von Listerien (JONES und WOODBINE, 1961; WEIS, 1975 b). Listerienpositive Wanderschafherden wurden mitunter als Infektionsquelle für andere Tiere angesehen (BELLER und ZELLER, 1951; VON DER AA, 1961 und 1963).

Listerien können auch über Nasen- und Vaginalsekret sowie über die Milch ausgeschieden werden (DEDIE, 1955; LEHNERT, 1964; EL GABBAR MOHAMMED, 1969; RALOVICH, 1987).

2.7.1.2 Pathogenese

Listerien gehören zu den beweglichen und intrazellulär vermehrungsfähigen Infektionserregern, die auch in Phagozyten überleben können (AMISBERG, 1979). Diese pathogenen Eigenschaften sind wichtige Voraussetzungen für das Zustandekommen zerebraler Listerioseerkrankungen. Wie experimentelle Untersuchungen von RACZ und Mitarb. (1973, 1975) zeigten, sind Listerien in der Lage, die Epithelschranke intakter Schleimhäute zu überwinden und sich in lebenden Epithelzellen zu vermehren. Infizierte epitheliale Herde werden alsbald von polymorphkernigen Leukozyten infiltriert, die extrazellulär liegende und aus den Epithelzellen austretende Listerien eliminieren. Schon zwölf Stunden nach der Inokulation treten gehäuft Monozyten auf, die den Erreger zwar phagozytieren, ihn aber nicht vernichten können. Später entstehen intraepitheliale "Mikroabszesse".

Bei der zerebralen Form der Listeriose von Wiederkäuern wird ein Erregereintritt über die Schleimhäute des Kopfes, insbesondere der Mundschleimhaut, angenommen. Geeignete Eintrittspforten sind durch Verletzungen oder Epitheldefekte der Schleimhäute gegeben, wie sie bei grobstengeligem Rauhfutter fressenden Wiederkäuern öfters auftreten können. Auch Zahnbrüche, Zahnverluste und Zahnwechsel ermöglichen eine Invasion der Erreger (ASAMI et al., 1957; URBANECK, 1962; BARLOW und MC GORUM, 1985; LOW und LINKLATER, 1985). Durch experimentelle Inokulation von *L. m.* auf oralem, intralabialem, intrabuccalem, intralingualem, intra- und perineuralem und konjunktivalem Wege, aber auch über eröffnete Zahnalveolen und Pulpahöhlen

konnten im Gehirn der Versuchstiere die spontan auftretenden Veränderungen zerebraler Listeriose reproduziert werden (ASAHI et al., 1957; URBANECK, 1961; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; URBANECK und SCHLEICHER, 1963; JAKOB, 1963 und 1967; LEHNERT, 1964; PÖTEL, 1968; PÖTEL et al., 1969; BARLOW und MC GORUM, 1985).

Der von einigen Autoren zunächst vermutete hämatogene Infektionsmodus (FLAMM, 1957; CORDY und OSEBOLD, 1959; MATTHIAS, 1961 u. a.) führt zu einem grundsätzlich anderen Verteilungsmuster der Veränderungen als bei spontaner Gehirnlisteriose (JAKOB, 1963; URBANECK und SCHLEICHER, 1963; URBANECK und RITTENBACH, 1963; PÖTEL et al., 1969; JUBB und KENNEDY, 1970). Heute gilt der neurogene Infektionsmodus im Falle der Hirnstammenzephalitis als allgemein akzeptiert (BARLOW und MC GORUM, 1985), wobei eine sekundäre hämatogene Ausbreitung vom Gehirn aus durch Einbrechen des Infektionsprozesses in die Gefäße nicht ausgeschlossen wird (URBANECK et al., 1963). So konnte durch Neurektomie infizierter Gehirnnerven eine neurogene Besiedelung des Stammhirnes verhindert werden (URBANECK et al., 1966).

Nach Überwinden der Schleimhautbarriere gelangen die Listerien direkt an die peripheren Abschnitte der Gehirnnerven. Dort kann sich eine ascendierende, aber klinisch nicht auffallende Neuritis bzw. Ganglioradiculoneuritis entwickeln. Wie elektronen- und lichtmikroskopische Studien zeigen (CHARLTON, 1977; CHARLTON und GARCIA, 1977), wandern die Listerien intraaxonal und sind dadurch vor den Abwehrmechanismen des Immunsystems geschützt (BARLOW und MC GORUM, 1985). Krankheitserscheinungen werden demzufolge i. A.

erst festgestellt, wenn die Erreger das Zentralnervensystem ergriffen haben (POTEL et al., 1969). Durch zentripetale Ausbreitung über die Gehirnnerven, vorwiegend über N. trigeminus (V.) und N. glossopharyngeus (IX.), seltener über N. intermediofacialis (VII.) und N. hypoglossus (XII.) (ASAHI et al., 1957; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; URBANECK, 1962; URBANECK et al., 1963; URBANECK und SCHLEICHER, 1963; POTEL et al., 1969; CHARLTON und GARCIA, 1977; BARLOW und MC GORUM, 1985; LOW und LINKLATER, 1985) erreichen die Listerien Ganglien und Nervenwurzeln sowie auch die Meningen und schließlich die entsprechenden Kerngebiete im Rautenhirn. Hier entwickelt sich eine vorwiegend auf den Hirnstamm begrenzte Meningoenzephalitis (V. SANDERSLEBEN et al., 1981; DAHME und WEISS, 1988). Danach schreitet das Infektionsgeschehen im Hirnstamm weiter fort und erfaßt allmählich die efferenten Leitungssysteme mit den entsprechenden Folgen. Zunächst werden im Rautenhirn die motorischen Äste der Gehirnnerven geschädigt, z. B. des N. trigeminus (Zähneknirschen), N. facialis (Gesichtslähmungen) oder N. vestibulocochlearis (Gleichgewichtsstörungen), später ergreift die Infektion auch das Mittelhirn, z. B. N. oculomotorius (Nystagmus).

2.7.1.3 Inkubationszeit

Die ersten klinischen Symptome treten bei Gehirnlisteriose frühestens 4 Tage (VON DER AA, 1961), spätestens 32 Tage (LOW und LINKLATER, 1985), im Durchschnitt jedoch ca. 10 - 21 Tage nach Beginn der Silagefütterung auf (KRÜGER, 1963; DIJKSTRA, 1965; WUILLERET et al., 1969; MAYER und STENG, 1975). Nach experimenteller Inokulation von L. m. in die Zahnpulpa von Schafen ließ sich histologisch bereits nach 6 Tagen

eine Enzephalitis nachweisen, während klinische Erscheinungen frühestens nach drei Wochen auftraten (BARLOW und MC GORUM, 1985).

2.7.1.4 Klinische Symptomatik

Das klinische Bild gleicht sich bei den verschiedenen Wiederkäuerspecies weitgehend (GRAY und KILLINGER, 1966).

In der Anfangsphase verläuft die Krankheit in vielen Fällen fieberhaft; später sinkt die Temperatur auf Normalwerte zurück (IWANOW, 1962; STÜBER, 1985). Die erkrankten Tiere sondern sich, sofern die Möglichkeit besteht, von der Herde ab und zeigen Benommenheit, Appetitlosigkeit, gelegentlich auch gastrointestinale Störungen oder Konjunktivitis (BRÄUER, 1966). Diese ersten Anzeichen fehlen aber auch häufig oder werden nicht bemerkt (JONES und WOODBINE, 1961).

Am zweiten bis dritten Tag folgen dann zentralnervöse Ausfallerscheinungen: einseitige, selten beidseitige (WEST und OBWOLO, 1987) Läsion des N. facialis mit Ptosis von Ohr, Oberlid und Oberlippe, seitliche Kopfhaltung durch Lähmung des N. vestibularis, Gleichgewichtsstörungen, Dreh- und Manegebewegungen, Vorwärtsdrang, Anlehnungsbedürfnis an feste Gegenstände und Zittern (JENTZSCH, 1959; LINSERT, 1959; BIENFET et al., 1969; BRÄUER, 1966; OHSHIMA et al., 1974; STÜBER, 1985; DIJKSTRA, 1987). Gelegentlich beobachtet man Torticollis, Nystagmus, Opisthotonus, Keratokonjunktivitis, Blindheit, Zähneknirschen, Krämpfe und Hyperästhesie der Haut (OLAFSON, 1940; SCHULTE und SCHOLZ, 1956; GRAY und KILLINGER, 1966; OHSHIMA et al., 1974; MAYER und STENG, 1975; REBHUN und DELAHUNTA, 1982). Mitunter wurden sogar tollwutähnliche Erregungserscheinungen und Aggressivität gesehen (POPPENSIEK, 1944; LINSERT, 1957).

Im anschließenden paralytischen Stadium schreiten die Lähmungserscheinungen an Kopf-, Hals- und Gliedmaßenmuskulatur fort. Futter- und Wasseraufnahme der Tiere sind durch die Paralyse von Gaumen, Zungen-, Schlundkopf- und Kaumuskulatur behindert. Infolge der dadurch bedingten Schluckbeschwerden kommt es zu stärkerer Salivation oder zur Ansammlung von Futterresten in der Bockentasche der gelähmten Seite (OLAFSON, 1940; BIENFET et al., 1969; REBHUN und DELAHUNTA, 1982; STÖBER, 1985). Das Fortschreiten der Erkrankung zeigt sich in zunehmender Teilnahmslosigkeit der Tiere an der Umgebung und unkoordinierten, ziellosen Bewegungen. Ab dem fünften Tag etwa kommen die Tiere zum Festliegen. Sie zeigen dabei öfters Ruderbewegungen (BRÄUER, 1966) oder rutschen bei ausgeprägtem Bewegungsdrang sogar im Liegen im Kreis herum (STÖBER, 1985). Schließlich gelangen die Tiere durch zunehmende Exsikkose in einen komatösen Zustand (BIENFET et al., 1969) und sterben infolge Atemlähmung (STÖBER, 1985).

Die nur gelegentlich vorkommenden Selbstheilungen werden vorwiegend in Schafherden beobachtet, die schon seit Jahren verseucht sind (POTEL, 1963). Auch beim Rind sind Spontanheilungen die Ausnahme und es bleiben noch lange Zeit postenzephalitische Folgeschäden bestehen (DIJKSTRA, 1965; BRÄUER, 1966).

2.7.1.5 Krankheitsdauer

Die Krankheitsdauer variiert bei Schaf und Ziege von minimal 4 Stunden (URBANECK und LIPPMANN, 1961) bis zu 48 Stunden (WUILLERET et al., 1969) in unverseuchten Herden, während in Listeriose-Betrieben die Tiere durchschnittlich 2 bis 5 Tage, in seltenen Fällen auch erst

10 Tage nach Auftreten der ersten Symptome verenden (JENTZSCH, 1959; URBANECK und LIPPANN, 1961; BIENFET et al., 1969; WUILLERET et al., 1969; WEIS, 1965; GRAY und KILLINGER, 1966; MAYER und STENG, 1975).

Bei Rindern endet die enzephalitische Verlaufsform gewöhnlich nach 4 bis 15 Tagen mit dem Tode (BRÄUER, 1966; GRAY und KILLINGER, 1966; BIENFET et al., 1969).

2. .2 Metrogene Form

Diese Form der Listeriose wurde für das Rind in Deutschland zuerst von DEDIE (1955) beschrieben.

Diese ihrem Wesen nach hämatogene Infektion äußert sich im Auftreten von Aborten, Frühgeburten oder termin-gerechten Geburten lebensschwacher Neugeborener ohne zentralnervöse Störungen (AMTSBERG, 1980). Listerien-aborte treten beim Rind zwischen dem 4. und 8. Trächtig-keitsmonat, beim Schaf zwischen dem 2. und 5. Monat auf (HARTWIGK und RENK, 1956; LINSERT, 1957; IWANOW, 1962; DIJKSTRA, 1965 und 1987; BIENFET et al., 1969). Die Inkubationszeit ist der bei zerebraler Verlaufsform beschriebenen vergleichbar (BIENFET et al., 1969).

Erste klinische Zeichen vor dem Abort bestehen in leichten Störungen des Allgemeinbefindens, Inappetenz, erhöhter Körpertemperatur, Unruhe, Anschwellen des Euters und Einfallen der Beckenbänder. Kurz vor Austrei-ben der Frucht zeigt sich klarer, mit Blut vermischter Schleim (HARTWIGK und RENK, 1956; BRÄUER, 1966; AMTSBERG, 1980). Die diaplazentar erfolgende Infektion der Feten ruft bei diesen eine omphalogene Septikämie hervor. Dem-gegenüber erkranken die Muttertiere, wenn überhaupt, nur an einer leichten und vorübergehenden serös-eitri-gen Metritis mit Gebärmutterkatarrh (DEDIE, 1955;

LINSERT, 1957; JENTZSCH, 1959; BRÄUER, 1966). Bei Nachgeburtsverhaltung können jedoch stärkere Endometritiden oder septische Metritiden auftreten (HARTWIGK und RENK, 1956; DIJKSTRA, 1965). Der Nachweis der Listerien gelingt sowohl aus dem Fetus als auch aus den Kotyledonen (LINSERT, 1957).

2.7.3 Septikämische Form

An septikämischer Listeriose erkranken vorwiegend Neugeborene und Lämmer in den ersten Lebenswochen und -monaten, in einem Alter also, in dem die Tiere nur über geringe körpereigene Abwehrkräfte verfügen (JAKOB, 1963; DIJKSTRA, 1987). Obwohl auch erwachsene Wiederkäuer an der septikämischen Form erkranken können, (GRAY und KILLINGER, 1966), ist dieser Krankheitsverlauf bei ihnen im allgemeinen selten, da sie gegenüber Listerien über eine hohe Allgemeinresistenz verfügen (MATTHIAS, 1961; JAKOB, 1963 und 1967 b). Durch Herabsetzung der natürlichen Körperresistenz gelingt es experimentell auch bei älteren Schafen, eine Listerienseptikämie auszulösen (JAKOB, 1963 und 1967 a + b). Bei Kälbern ist ein septikämischer Verlauf ebenfalls selten (DIJKSTRA, 1987).

Die Krankheitserscheinungen sind unspezifisch und äußern sich in Benommenheit, Inappetenz, Fieber, Schwäche, Atembeschwerden und Durchfall (GRAY und KILLINGER, 1966; LOW und LINKLATER, 1985). Der Tod tritt innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach konnataler oder lokaler Infektion über den Nabel ein, nach oraler Infektion gewöhnlich erst nach 2 bis 3 Tagen (IWANOW, 1962; LOW und LINKLATER, 1985).

2.7.4 Atypische Formen

Als selbständige durch L. m. bedingte Organerkrankung werden in seltenen Fällen atypisch verlaufende Mastitiden beschrieben (WRAMBY, 1944; DE VRIES und STRIKWERDA, 1956). Auch experimentell läßt sich durch galaktogene Infektion des Euters eine vorübergehende, galtähnliche Mastitis erzeugen (DEDIE, 1955). Eine Euterinfektion kann als akute, fieberhafte Mastitis mit Sekretveränderung und beträchtlich erhöhtem Zellgehalt verlaufen (DEDIE, 1955) oder als milde, unspezifische Mastitis ohne Störung des Allgemeinbefindens (DE VRIES und STRIKWERDA, 1956). Der Nachweis von Listerien in der Milch gelang jedoch auch bei Kühen, die keinerlei Anzeichen einer Euterentzündung aufwiesen (SIPKA et al., 1973).

LINSERT (1959) beschrieb bei Wiederkäuern eine durch L. m. hervorgerufene Keratokonjunktivitis. Häufig wird jedoch eine Trübung der Kornea mit Tränenfluß nur als Sekundärerkrankung nach Schädigung des N. fazialis (REBHUN und DELAHUNTA, 1982) oder als Expositions-keratitis beobachtet (STÜBER, 1985).

Eine ausgedehnte Leptomeningitis ohne entzündliche Beteiligung des Hirngewebes wird hin und wieder bei Schafen gefunden. Die Symptome sind ähnlich denen der zerebralen Verlaufsform (SCHULTE und SCHOLZ, 1956; PALLASKE, 1958; URBANECK und LIPPMANN, 1961). GATES et al. (1967) berichten über eine Listerien-Myelitis bei Lämmern, ohne daß Läsionen im Hirnstammbereich gefunden wurden. Die Tiere zeigten eine vollständige Paralyse der Extremitäten.

Krankheitsverlauf beim Menschen

Das Wesen der listeriosebedingten Veränderungen der verschiedenen Tierarten stimmt mit dem beim Menschen völlig überein (PALLASKE, 1958; WUILLERET et al., 1969). Wenn auch eine scharfe Trennung der einzelnen klinischen Verlaufsformen nicht immer möglich ist (NICOLAI-SCHOLTEN et al., 1985), lassen sich die Krankheitserscheinungen beim Menschen grob einteilen in:

1. Akut-septische Form (Neugeborenenlisteriose, "Granulomatosis infantiseptica")

Sie tritt häufig als Schwangerschaftslisteriose auf. Bei der Mutter wird während der Schwangerschaft oft nur ein grippeähnliches Bild mit Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Nierenschmerzen, Durchfall und Atemnot bemerkt. Nach Tagen oder wenigen Wochen erfolgt dann eine Früh- oder Fehlgeburt. Beim Neugeborenen verläuft die Infektion entweder unter dem Bild einer Sepsis und/oder Bronchopneumonie am 2. bis 3. Lebenstag (Frühtyp) oder mit einer Meningitis am 7. bis 9. Tag p. p. (Spättyp). Die Mortalität ist in beiden Fällen hoch (JENTZSCH, 1959; SEELIGER und EMMERLING, 1970; HIRSCHL et al., 1980; EMMERLING et al., 1986; GOMEZ-MAPASO, 1987).

2. Listeriose des Zentralnervensystems

Hierbei unterscheidet man nach SEELIGER (1982) weitere vier Formen:

- a) reine eitrige Meningitis
- b) Meningo-Enzephalitis
- c) fulminante Enzephalitis
- d) klassische Enzephalitis ohne Beteiligung der Meningen

Die klinischen Erscheinungen treten überwiegend in zwei Altersgruppen auf: bei Neugeborenen zwischen dem 5. und 20. Lebenstag und bei abwehrgeschwächten Erwachsenen jenseits des 45. Lebensjahres (SEELIGER, 1982; EMMERLING et al., 1986).

Bei Säuglingen beobachtet man als erste Symptome Fieber und gastrointestinale Störungen, nach 2 bis 3 Tagen treten dann respiratorische und neurologische Störungen hinzu.

Erwachsene klagen anfangs eher über gastrointestinale und pulmonale als über neurologische Beschwerden. Als häufigstes Initialsymptom werden heftigste Kopfschmerzen, begleitet von Somnolenz bis hin zu Verwirrheitszuständen, angegeben. Die voll ausgebildete Listeriose-Meningitis unterscheidet sich klinisch in keiner Weise von anderen bakteriellen Hirnhautentzündungen. Bei der Meningoenzephalitis gelangen je nach Infektionsweg und Sitz der infektiösen Herde verschiedene Symptome zum Durchbruch: Ptosis, Miosis, Nystagmus, Sehstörungen, Schwindel, Krampfanfälle und vegetative Störungen. Primäre neurogene Enzephalitiden, die im Gegensatz zum Tier beim Menschen außerordentlich selten sind, manifestieren sich als Diplopie, Ptosis, Nystagmus, Dysarthrie, Dysphonie, Fazialisparese und Hemiparese.

Zerebrale Listerioseinfektionen des Menschen unterscheiden sich pathogenetisch in keiner Weise von denen beim Tier. Verlaufsformen und Symptomatik der Gehirnlisteriose hängen freilich davon ab, ob die Infektion auf neurogenem oder hämatogenem Wege erfolgte. Anders als beim Tier scheinen die Keime beim Menschen das Gehirn bevorzugt über den Blutweg zu erreichen. Leider wird in Studien über menschliche Gehirnlisteriose die Differenzierung neurogener und hämatogener Formen häufig nicht berücksichtigt.

Histologisch weicht die Listeria-Meningitis bzw. Meningoenzephalitis des Erwachsenen nicht von der des Neugeborenen ab. Das entzündliche Exsudat besteht vorwiegend aus Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten. Granulome treten ebenfalls auf. Bei der rein enzephalitischen Form finden sich häufig zahlreiche kleine Abszesse, bevorzugt innerhalb des Stammhirns (SCHREITENBRUNNER et al., 1986).

Die Listeriose des Zentralnervensystems betrifft häufiger das männliche Geschlecht (60 - 78 %), gleichgültig, ob bei Neugeborenen oder Erwachsenen (GOMEZ-MAPASO, 1980; NICOLAI-SCHOLTEN et al., 1985; SCHREITENBRUNNER et al., 1986).

Die Mortalität liegt auch bei rechtzeitiger Behandlung zwischen 30 % und 50 % (POTEL, 1968; AMTSBERG, 1980; NICOLAI-SCHOLTEN, 1985; SCHREITENBRUNNER et al., 1986).

3. Glanduläre Form (Lymphadenitis, Monozytenangina)

Diese seltenere Form tritt als grippeähnliche Erkrankung mit Angina sowie Lymphknotenschwellung im Bereich von Hals und Nacken in Erscheinung (AMTSBERG, 1980).

4. Lokale Form

Bei beruflich exponierten Tierärzten und Landwirten wurden papulöse und pustulöse Hauteffloreszenzen beschrieben (KALKOFF und SCHIFF, 1960; DIJKSTRA, 1965).

5. Chronisch-septische Form (Endokarditis, Abszeß, Endophthalmitis, Hepatitis).

Diese Form verläuft ohne besondere Leitsymptome (AMTSBERG, 1980; EMMERLING et al., 1986).

Von allen Verlaufsformen beim Menschen werden die Infektionen des ZNS am häufigsten diagnostiziert.

Der Anteil zerebraler Formen an allen menschlichen Listeriosefällen beträgt über 50 % und kann bis zu 73 % erreichen (BLENDE und SZATALOWICZ, 1967; HOOD, 1975; NICOLAI-SCHOLTEN et al., 1985).

2.9 Jahreszeitliches Auftreten

Die Listeriose der Wiederkäuer weist aufgrund der Silagefütterungsperioden saisonale Schwankungen auf. Die meisten Fälle werden zwischen Januar und Juni beobachtet. Höhepunkte zerebraler Listeriose werden in den Monaten März, April und Mai erreicht (LINSERT, 1957; CORDY und OSEBOLD, 1959; URBANECK und LIPPMANN, 1961; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; VON DER AA, 1963; BIENFET et al., 1969; VALLEE et al., 1972; BÜNING, 1975; WEIS, 1975 b; BARLOW und MC GORUM, 1985; GLEDEL, 1987; RALOVICH, 1987). Der metrogene Verlauf tritt schon etwas früher in Erscheinung und zwar in den Monaten Dezember bis April mit Höhepunkt im Februar (ANONYM, 1983; DIJKSTRA, 1987). In wenigen Betrieben verteilen sich die Listeriosefälle auf das ganze Jahr (LINSERT, 1959; LEVADITI et al., 1975).

Menschliche Listerioseerkrankungen, insbesondere die Schwangerschaftslisteriose, treten hingegen erst im Sommer und Frühherbst mit Gipfel im Juli vermehrt auf (POTEL, 1968).

2.10 Histopathologie

Nach PALLASKE (1958), KNÜSEL und Mitarb. (1968), GITTER (1985) und DE VARGAS PEIXOTO (1986) entsprechen sich die histologischen Befunde von Schaf und Rind. Die Läsionen sind bei den verschiedenen Wiederkäuern qualitativ dieselben, sie unterscheiden sich nur im Stärkegrad (JUBB und KENNEDY, 1970).

2.10.1 Topographie

Wie Tabelle 5 zeigt, sind die schwersten und häufigsten Veränderungen im hinteren Hirnstammbereich zu finden. Am ausgeprägtesten sind Pons (Varoli) und Medulla oblongata betroffen. Auch das Mittelhirn ist häufig stärker in den Prozeß miteinbezogen (PALLASKE, 1958; CORDY und OSEBOLD, 1959; URBANECK und LIPPMANN, 1961; FATZER und STECK, 1974), während sich in anderen Bereichen des Gehirns nur geringgradige Veränderungen zeigen oder sie gänzlich fehlen (DIJKSTRA, 1965; BRÄUER, 1966; WEIS, 1967; WINKENWERDER, 1967; KNÜSEL et al., 1968; FATZER und STECK, 1974; UHSHIMA et al., 1974; AMISBERG, 1979 und 1980; GITTER, 1985; DE VARGAS PEIXOTO, 1986; DAHME und WEISS, 1988).

Die Leptomeninx zeigt in basalen und kaudalen Teilen des Gehirns die stärksten Läsionen (CORDY und OSEBOLD, 1959; MATTHIAS, 1961; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; URBANECK et al., 1963; WUILLERET et al., 1969). Das Endhirn, insbesondere der Hirnmantel mit Ammonshorn, ist fast immer frei von entzündlichen Erscheinungen (URBANECK und LIPPMANN, 1961; MATTHIAS, 1961; URBANECK et al., 1963).

Tabelle 5 Topographie der Listerienencephalitis bei Schaf und Rind

Jahr	Autoren	Lokalisation der Veränderungen		
		am stärksten	weniger stark	nur gering
1956	LINSERT	Pons, Medulla		
1958	CORDY u. OSEBOLD	Pons, Medulla, Mittelhirn	Kleinhirn, Zwischenhirn, Halsmark	Corp.striatum, Großhirn, Olfactorius-Gebiet
1958	PALLASKE	Pons, Medulla, Vierhügel, Sehhügel, Corp. striatum	Kleinhirn, Halsmark	
1959	JENTZSCH	Pons, Medulla		
1961	MATTHIAS	Pons, Medulla	Vierhügel, Thalamus, Kleinhirn, Halsmark	
1961	URBANECK u. LIPPMANN	Pons, Medulla, Vierhügel	Sehhügel, Kleinhirn, Halsmark	
1962	TRAUTWEIN u. BEHRENS	Pons, Medulla	Vierhügel, Großhirnschenkel, Kleinhirnschenkel, Halsmark	
1963	URBANECK et al.	Pons, Medulla	Mittelhirn, Halsmark	Kleinhirnmark, Zwischenhirn, Großhirn-Stammganglien
1969	POTEL et al.	Pons, Medulla		
1969	WUILLERET et al.	Pons, Medulla	IV. Ventrikel, Kleinhirnschenkel, Mittelhirn, Halsmark	Epiphyse, Thalamus, Hypothalamus, Corp. striatum, Kleinhirn, Großhirnhemisphären
1969	BIENFET et al.	Pons, Medulla	Kleinhirn, Mittelhirn	
1974	FATZER u. STECK	Pons, Medulla, Mittelhirn		
1977	CHARLTON u. GARCIA	Pons, Medulla	Mittelhirn, Zwischenhirn, Halsmark	
1985	GITTER	Pons, Medulla		
1985	LOW u. LINKLATER	Pons, Medulla		
1985	BARLOW u. MC GORUM	Pons, Medulla		
1986	DE VARGAS PEIXOTO	Hirnstamm, Medulla oblongata	Kleinhirn	Großhirn, Rückenmark

Die Gehirnteile sind meistens einseitig histologisch verändert. Die Reaktionen können auch beidseitig auftreten, sind dann aber stets asymmetrisch betont (PALLASKE, 1955; URBANECK et al., 1963; WUILLERET et al., 1969; BARLOW und MC GORUM, 1985).

Nach POTÉL et al. (1969) ist die Lokalisation im wesentlichen vom Ort der Eintrittsstelle der Erreger ins Gehirn abhängig, und nicht von örtlichen Besonderheiten in der Gefäßversorgung oder sonstigen strukturellen oder funktionellen Eigenheiten des Hirnstammes. Die enzephalitischen Prozesse bei der Gehirnlisteriose sind im wesentlichen in den Kern- und Bahngebieten des N. trigeminus, N. facialis, N. glossopharyngeus und N. hypoglossus lokalisiert, während der benachbarte motorische Vagus Kern stets frei von Entzündungserscheinungen ist (ASAHI et al., 1957; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; URBANECK und SCHLEICHER, 1963; POTÉL et al., 1969; CHARLTON und GARCIA, 1977; BARLOW und MC GORUM, 1985; LOW und LINKLATER, 1985).

Je weiter man sich bei der histologischen Untersuchung vom Rautenhirn entfernt, umso mehr schwächen sich die Schädigungen ab (WUILLERET et al., 1969). Die Enzephalitis lokalisiert sich ohne Bevorzugung der grauen oder weißen Substanz (PALLASKE, 1955 und 1958; MATTHIAS, 1961; URBANECK et al., 1963; GRAY und KILLINGER, 1966).

2.10.2 Charakter der entzündlichen Prozesse

Makroskopisch wird das Gehirn allgemein als unverändert beschrieben, abgesehen von leichter Hyperämie und leichtem Ödem der Meningen. Manchmal kann die Hirnrinde petechiale Blutungen aufweisen und der Liquor cerebrospinalis vermehrt sein (BRÄUER, 1966; GRAY und KILLINGER, 1966; HOFMANN, 1981).

Nach CORDY und OSEBOLD (1959) kann man histologisch zwei Typen von Läsionen unterscheiden:

1. Herdförmige parenchymale Infiltrate
2. Vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate

In den parenchymalen Schädigungsbezirken treten anfangs Makrophagen auf. Mit zunehmend stärker werdender Schädigung rücken dann neutrophile Granulozyten zahlenmäßig immer mehr in den Vordergrund, bis schließlich durch Zusammenfließen mehrerer Herde flächenhafte Eiteransammlungen entstehen. In älteren Entzündungsherden werden zentrale Nekrosen und Demyelinisierung gefunden, Makrophagen wandeln sich in Gitterzellen um. Herdförmige Parenchyminfiltrate sind entweder vorwiegend leukozytär oder monozytär geprägt. Meist kommen beide Reaktionstypen gleichzeitig vor, wobei einer überwiegt. Häufig finden sich dabei Monozyten bzw. Makrophagen in der Peripherie und die Leukozyten im Zentrum größerer Infiltratherde, wodurch diese ein abszeßähnliches Aussehen erhalten. Miliare Herdbildungen haben mitunter auch granulomatösen Charakter.

Entzündlich veränderte Arteriolen und Venolen erscheinen perivaskulär manschettenförmig infiltriert. Häufig dominieren dabei Lymphozyten und Monozyten, während polymorphkernige Leukozyten nur bei starken entzündlichen Reaktionen gefunden werden (CORDY und OSEBOLD, 1959; MATTHIAS, 1961; URBANECK et al., 1963; WUILLIÉRI et al., 1969; MANZ und FÖRSTER, 1972; VALLEE et al., 1972; FATZER und STECK, 1974; OHSHIMA et al., 1974; CHARLTON und GARCIA, 1977; BARLOW und MC GORUM, 1985; LOW und LINKLATER, 1985; DE VARGAS PEIXOTO, 1986). Gelegentlich sind auch eosinophile Granulozyten zu beobachten.

Welche Zelltypen überwiegen, hängt von der Menge der eingedrungenen Bakterien, der Krankheitsdauer (perakut: leukozytärer Charakter, subakut: gliös-monozytärer Charakter), der Toxizität der Erreger und der Abwehrbereitschaft des Gewebes ab (URBANECK et al., 1963). Die Hirnhäute sind regelmäßig in Form einer herdförmigen lympho-monozytären Leptomeningitis beteiligt. Hier treten polymorphkernige Granulozyten nur selten auf (PALLASKE, 1955; WINKENWERDER, 1967; WEIS, 1967; KNOSEL et al., 1968; CALLEE et al., 1972; FATZER und STECK, 1974; OHSHIMA et al., 1974; GITTER, 1985; DE VARGAS PEIXOTO, 1986).

Selten sind beim Rind die histologischen Veränderungen so ausgeprägt wie beim Schaf, was für den mehr chronischen Verlauf beim Rind spricht. Besonders die perivaskulären Ummantelungen mit Entzündungszellen sollen geringgradiger sein (GRAY und KILLINGER, 1966).

Im Gegensatz zu den eitrigen Enzephalitiden, die von den meisten Autoren beschrieben werden, berichten einige andere über nichteitrig lymphozytäre Meningo-encephalitiden bei der Gehirnlistriose der Wiederkäuer (DIJKSTRA, 1965; WEIS, 1973; HOFMANN, 1981; ROLLE und HAYR, 1984).

2.10.3 Mikroskopischer Nachweis der Bakterien

Nach Ansicht zahlreicher Berichterstatter (PALLASKE, 1955; LINSERT, 1956; CORDY und OSEBOLD, 1959; MATTHIAS, 1961; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; URBANECK et al., 1963; WUILLERET et al., 1969; FATZER und STECK, 1974; VON SANDERSLEBEN et al., 1981; DAHME und WEISS, 1988) können Listerien mit den üblichen histologischen Färbungen ohne Schwierigkeiten in vielen Fällen nachgewiesen werden. Nach WUILLERET et al. (1969) ist dazu die Nissl-Färbung am geeignetsten. Ihrer Meinung nach ist dieser mikroskopische Erregernachweis dem kulturellen bakteriologischen Nachweis überlegen. Beim Rind sollen die Bakterien einzeln oder in kleinen Haufen zusammenliegen, während sie beim Schaf dichte Plaques bilden (GRAY und KILLINGER, 1966).

Die Erreger kommen fast nur zusammen mit Leukozyten vor, am stärksten in größeren parenchymalen Eiterherden. Wenn keine Leukozyten vorhanden sind, ist auch die Erregeranzahl sehr viel geringer. Die Bakterien liegen extrazellulär zwischen den Leukozyten oder intrazellulär in Leukozyten oder Makrophagen phagozytiert (URBANECK et al., 1963; WUILLERET et al., 1969; VON SANDERSLEBEN et al., 1981; DAHME und WEISS, 1988). Die Morphologie der Listerien kann recht variabel sein (URBANECK et al., 1963), weshalb es oft schwierig ist, sie allein nach der Morphologie von ähnlich aussehenden Organismen zu unterscheiden (SMITH und METZGER, 1962). Jedoch spricht eine Enzephalitis, bei der grampositive Stäbchen nachgewiesen werden, sehr für Listeriose (SMITH et al., 1968).

2.10.4 Bewertung der histologischen Diagnose

Die Aussagen über die Werteinschätzung der histologischen Diagnose bei Listeriose variieren sehr.

Zur Sicherung der Diagnose bedarf es nach Ansicht vieler Autoren unbedingt des bakteriologischen Erregernachweises (GRAY und KILLINGER, 1966; SEELIGER, 1982). Gelingt der Erregernachweis mit bakteriologischen Methoden nicht, kommt der histologischen Untersuchung besondere Bedeutung zu, da das histologische Bild der enzephalitischen Veränderungen sowohl beim Rind (BRÄUER, 1966; KNÖSEL et al., 1968; GITTER, 1985) als auch beim Schaf (URBANECK und LIPPMANN, 1961; POTEL et al., 1969; AMTSBERG, 1979 und 1980; BARLOW und MC GORUM, 1985; MANZ und FÖRSTER, 1972; WUILLERET et al., 1969; GITTER, 1985) für den Erreger pathognomonisch sein soll.

Nach GITTER (1985) ist der Erregernachweis allein nicht beweisend für eine sichere Diagnose, sondern es muß unbedingt eine histologische Untersuchung erfolgen, da Mischinfektionen möglich sind. Während manche das histologische Bild nur als Ergänzung zur bakteriologischen Untersuchung betrachten (GRAY und KILLINGER, 1966; AMTSBERG, 1979 und 1980), halten andere Autoren es für berechtigt, die Diagnose allein aufgrund des Vorliegens einer gemischtzelligen, meist eitrigen Meningoenzephalitis mit Beschränkung auf den Hirnstammbereich zu stellen, auch wenn der bakteriologische Nachweis nicht gelingt. Dabei müssen allerdings epidemiolog. Situation, Vorbericht und klinisches Bild berücksichtigt werden (JENSEN und MACKEY, 1949, zit. n. URBANECK und LIPPMANN, 1961; KNÖSEL et al., 1968; PALLASKE, 1958; WUILLERET et al., 1969; MANZ und FÖRSTER, 1972; BÜNING, 1975; GITTER, 1985; BARLOW und MC GORUM, 1985; DEDIE und BOSICDI, 1985).

Durch die kennzeichnenden Gehirnläsionen können im histologischen Schnitt andere, mit zentralnervösen Störungen einhergehende Erkrankungen, insbesondere Virusinfektionen, von der Listeriose abgegrenzt werden. Allerdings sollte aus Sicherheitsgründen Tollwut durch eine spezielle Untersuchung stets ausgeschlossen werden (KNÜSEL et al., 1968).

Bei Schafen mit Gehirnlisteriose wurden nur in etwa 6 % der Fälle atypische histologische Gehirnveränderungen festgestellt. Diese bestanden aus Infiltraten nicht nur im Stammhirn, sondern auch in anderen oder allen Gehirnteilen. In zwei Fällen lag nur eine eitrige Meningitis vor. In diesen Fällen ist eine bakteriologische Untersuchung unbedingt erforderlich (URBANECK und LIPPMANN, 1961).

Auch von FRAPPIER und Mitarb. (1966) wird die histologische Gehirnuntersuchung als eine besonders leistungsfähige und schnelle diagnostische Methode gegenüber der kulturellen und fluoreszenzserologischen Untersuchung herausgestellt.

Immer wieder werden Unterschiede in den bakteriologischen und histologischen Untersuchungsergebnissen festgestellt. Wenn jedoch die o. g. charakteristischen Entzündungserscheinungen vorliegen und gleichzeitig listerienähnliche Bakterien im histologischen Präparat nachgewiesen werden können, dann läßt sich auch ohne den kulturellen Nachweis eine sichere Diagnose stellen. Es ist nämlich keine andere Infektion mit Eitererregern bekannt, die solche Parenchymläsionen mit diesem Verteilungsmuster zeigt (WUILLERET et al., 1969).

Bei 186 an zerebraler Listeriose erkrankten Schafen fand BÜNING (1975) in 94,1 % der Fälle positive histo-

logische Befunde, davon wurden 12 Fälle (6,5 %) nur auf Grund des histologischen Bildes diagnostiziert. Bei 6 Tieren (3,2 %) konnte der Erreger bakteriologisch nachgewiesen werden, ohne daß histologische Veränderungen vorlagen.

2.11 Immunhistologie

Die erfolgreiche Anwendung der direkten und indirekten Immunfluoreszenztechnik bei Listeriose wurde von mehreren Untersuchern an Abklatschpräparaten (FRAPPIER et al., 1966; PITTMANN und CHERRY, 1968; FETEANU et al., 1969; HADZIMURATOVIC, 1969) und an Paraffinschnitten beschrieben (SMITH und METZGER, 1963; VILLELLA, 1963; BIFELLEISEN, 1964; PALMER et al., 1985).

OHMANN et al. (1981) und BUXTON et al. (1984) verwendeten die PAP-Technik zum Virusnachweis in Kryostat-schnitten, DUCATELLE et al. (1980 und 1982) in Paraffinschnitten. Listerien konnten erstmals mittels der ungekoppelten PAP-Reaktion an formalinfixierten Paraffinschnitten experimentell infizierter Mäuse von DOMINGO et al. (1986) nachgewiesen werden. DE VARGAS PEIXOTO (1986) konnte zeigen, daß diese Methode auch in routinemäßig hergestellten formalinfixierten Paraffinschnitten erfolgreich in der Listeriosediagnostik bei Hauswiederkäuern eingesetzt werden kann.

Eine der neuesten immunohistochemischen Entwicklungen stellt die Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik dar. Sie besitzt eine höhere Spezifität als alle übrigen antikörperkonjugierten Techniken und wurde bereits erfolgreich an paraffineingebetteten Schnitten erprobt (BOURNE, 1983).

5. Eigene Untersuchungen

5.1 Material und Methoden

Die Untersuchung umfaßte alle Gehirne von Rindern, Schafen und Ziegen, die vom 01.12.1986 bis 30.11.1987 an das Staatliche Tierärztliche Untersuchungsamt Aulendorf (STUA) mit dem Vorbericht einer ZNS-Erkrankung eingesandt wurden.

Das Einzugsgebiet des STUA umfaßt den Regierungsbezirk Südwürttemberg mit den Regionen Bodensee-Oberschwaben, Neckar-Alb und Donau-Iller. Zur Untersuchung kamen das Gehirn, der Kopf oder der ganze Tierkörper von insgesamt 215 Hauswiederkäuern. Das Gehirnmaterial wurde histologisch, bakteriologisch und immunhistologisch untersucht. Bei 62 histologisch positiven Tieren und ihren Herkunftsbetrieben wurden anamnestische Erhebungen durchgeführt.

5.1.1 Histologie

Zur histologischen Untersuchung standen die Gehirne von 183 Rindern, 29 Schafen und 3 Ziegen zur Verfügung.

5.1.1.1 Routinehistologie - H.E.-Färbung

Die wichtigste Aufgabe der routinemäßigen mikroskopischen Untersuchung des ZNS durch das STUA stellt die Untersuchung auf Tollwut dar. Hierzu wurden Abklatschpräparate vom Ammonshorn sowie vom Stammhirn entnommen und je eine 0,5 bis 1 cm dicke Scheibe vom Großhirn und Hirnstamm-bereich (Mittelhirn, Rautenhirn) in 10%igem Formalin fixiert. 24 h danach konnten von diesem Material mit dem Gefriermikrotom ca. 6 - 8 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Haemalaun-Eosin gefärbt werden.

3.1.1.2 Histologie - Nissl-Färbung

In Fällen, bei denen die routinehistologische Untersuchung eine Enzephalitis vom Listeriosetyp ergab (gemischtzellige, vorwiegend granulozytäre Hirnstammenzephalitis), die histologisch fraglich waren oder histologisch negativ aber bakteriologisch positiv waren, wurden zusätzlich an drei verschiedenen Lokalisationsstellen ca. 1 cm dicke Scheiben entnommen (Abb. 2 und Abb. 3):

1. Diencephalon und Telencephalon auf der Höhe der Hypophyse, 2. Mesencephalon, 3. Myel- und Metencephalon im Bereich der Pons (Varoli). Das Material wurde in 6%igem Formalin bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Fixierungsdauer betrug mindestens 48 h. Die Gewebesubstanz aus den drei Schnittebenen wurde in ca. 3 mm dicke Proben zurechtgeschnitten, davon Gefrierschnitte angefertigt und mit der Methode nach Nissl gefärbt (Abb. 2 und Abb. 3).

Durch die Größe der Mikrotom-Gefrierplatte bedingt konnten bei Lokalisation a und c nur die basalen Bereiche geschnitten werden. Im Zwischenhirn mußten linke und rechte Seite jeweils getrennt untersucht werden. Die Gewebsblöcke wurden vor dem Schneiden 1 - 2 h in Leitungswasser gewässert und mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Fa. Reichert-Jung) etwa 6 - 8 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach dem Aufziehen auf Objektträger mit Eiweißglyzerin wurden die Schnitte 24 h bei Zimmertemperatur getrocknet.

Die Nissl-Färbung mit Cresylviolett erfolgte in einem Färbeautomaten (VARISTAIN 24-3, SHANDON GmbH, Frankfurt) in folgenden Schritten:

- | | |
|--------------------------------------|-------------|
| 1. Leitungswasser | 10 min. |
| 2. Nissl-Farblösung | 10 min. |
| 3. Differenzieren in Alkohol (96 %). | 2 x 30 sec. |
| 4. Entwässern in Isopropanol (100 %) | 2 x 5 sec. |
| 5. Histosol | |
| 6. Einbetten in Eukitt | |

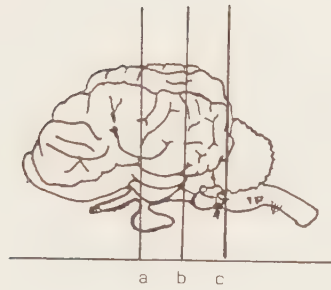


Abb. 2: Linke Seitenansicht eines Rindergehirnes. Schnittebenen im Bereich von Telencephalon und Diencephalon (a), Mesencephalon (b), Myel- und Metencephalon (c)



Abb. 3: Schematisierter Querschnitt eines Rindergehirnes im Bereich von Telencephalon und Diencephalon (a), Mesencephalon (b), Myel- und Metencephalon (c)

3.1.2 Bakteriologie

Von den insgesamt 213 untersuchten Gehirnen stammten 183 von Rindern, 28 von Schafen und 2 von Ziegen.

Aus dem Bereich des Großhirns bzw. Zwischenhirns, Rautenhirns und der Medulla oblongata wurden jeweils etwa 25 g Probenmaterial entnommen und in eine Anreicherungsbouillon überführt. Material, das an Wochenenden oder Feiertagen zur Untersuchung eingesandt worden war, blieb bis zur Weiterverarbeitung in sterilen Petrischalen im Kühlschrank.

3.1.2.1 Isolierung

Als Nachweisverfahren für L. m. in Gehirnmaterial diente die von TERPLAN und Mitarb. (1986) und DONNELLY (1987) beschriebene Methode der Food and Drug Administration (FDA), USA:

Die Durchführung der bakteriologischen Untersuchung von Großhirn, Rautenhirn und Medulla oblongata erfolgte jeweils getrennt.

1. Ansetzen des Anreicherungsmediums (3.1.7 A.)
Zu 225 ml des Basisnährbodens wurden unmittelbar vor dem Ansatz je 2,5 ml Supplement 1 und 2 zugegeben und gemischt.
2. Etwa 25 g Probenmaterial wurde unter sterilen Bedingungen den 230 ml des Anreicherungsmediums zugesetzt. War weniger Probenmaterial vorhanden, mußte das Anreicherungsmedium entsprechend verringert werden.
3. Homogenisieren im Ultraturrax-Gerät (Janke und Kunkel, IKA-Werk, Stauffen i. Br.).

1. Direktausstrich mittels einer Öse auf modifizierten Mc Bride-Agar (3.1.7 B), Inkubation der Platten 48 h bei 37° C.
2. Die Anreicherungs-suspension wurde zur Kälteanreicherung 7 Tage lang bei 4 - 6° C im Kühlschrank gehalten.
3. Bebrütung der Anreicherungs-suspension bei 30° C 7 Tage lang.
4. Nach 2 Tagen sowie nach 7 Tagen Ausstrich des Anreicherungs-materials: Hierfür wurde 1 ml der Anreicherungs-lösung in 9 ml KOH-Lösung (3.1.7 C) übertragen, gemischt und unmittelbar danach auf modifizierten Mc Bride-Agar mittels einer Öse ausgestrichen. Die KOH schädigt die Begleitflora stärker als die Listerien, wodurch man eine höhere Selektivität erzielt.
5. Inkubation der ausgestrichenen Mc Bride-Agarplatten 48 h bei 37° C.
6. Auswertung der bebrüteten Mc Bride-Platten mit der Schrägdurchleuchtungstechnik nach HENRY (1933). Hierzu mußten die Plattenkulturen von unten im Winkel von 45° durchleuchtet werden. Bei senkrechter Betrachtung der Kulturen von oben erschienen die Listeria-Kolonien blaugrün bis blaugrau.

Verdächtige Kolonien wurden auf Blutagarplatte ausgestrichen und 24 h bei 37° C bebrütet.

3.1.2.2 Bestätigung verdächtiger Isolate

Das Hämolysevermögen der Keime wurde auf Blutagarplatte beurteilt. *L. monocytogenes* zeigte dabei β -Hämolyse, dagegen konnte bei *L. innocua* keine Hämolyse beobachtet werden.

Von 24 h alten Kulturen wurde ein Nativpräparat mit steriler physiologischer Kochsalzlösung angefertigt und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die Listerien erschienen als kurze, an den Enden abgerundete, kokkoide Stäbchen. Ihre Motilität äußerte sich in charakteristischen taumelnden und rotierenden Bewegungen.

Bei der Differenzierung mittels Gramfärbung zeigten sich Listerien in jungen Kulturen als grampositive Stäbchen.

Zur Überprüfung der Katalaseaktivität mit 3%iger H_2O_2 -Lösung (3.1.7 F.) wurde ein Tropfen der Lösung mit einer Mikropipette auf die verdächtige Kolonie gegeben. Listeria-Kolonien setzten sofort lebhaft Sauerstoff frei, was sich im Aufschäumen der Kolonie äußerte.

In halbfestem SIM-Medium (3.1.7 E.a.) wurden die Beweglichkeit und in Kligler-Medium (3.1.7 E.b.) H_2S -Bildung geprüft. Die Beweglichkeit der Listerien zeigte sich nach Beimpfung des SIM-Mediums mit senkrechtem Einstich der Öse und nach 48stündiger Bebrütung bei $30^\circ C$ durch eine diffuse Eintrübung in unmittelbarer Umgebung des Stichkanals und an der Oberfläche. Da Listerien kein H_2S bilden, erfolgte im positiven Fall keine Farbveränderung des Kligler-Mediums.

Auf Blutplatten mit Äskulinzusatz haben Listerien Hydrolyse des Äskulins bewirkt: Wenn die Platten im UV-Licht (HANAU-Fluotest^R) betrachtet wurden, fluoreszierten die Kolonien nicht (Schwarzfärbung).

Eine weitere Differenzierung positiver Kulturen erfolgte anhand der Kohlenhydratspaltung. Die zu unter-

suchenden Keime wurden auf flüssiges Kulturmedium (3.1.7 G.) überimpft und 24 h bei 30° C inkubiert. Davon wurden jeweils 0,3 ml den Fermentationstest-Medien (3.1.7 H₁) zugegeben und eine Woche bei 37° C bebrütet. Bei Säurebildung aus den jeweiligen Kohlenhydraten schlug der zugesetzte Indikator infolge pH-Wertänderung von blau nach gelb um. L. m. bildete aus Glucose, Rhamnose und Salizin Säure ohne Gas, dagegen fand eine Spaltung von Dulzit, Mannit und Xylose nicht statt.

Das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg übernahm freundlicherweise die Bestätigung und Serotypisierung der isolierten *Listeria*-Stämme.

3.1.2.3 *Listeria*-Referenzstämme

Als eigene Referenzstämme standen folgende *Listeria*-Serotypen zur Verfügung:

Serovar	Nr. des Originalstammes	
1/2 a	NCTC 7973	ATCC = American Type
1/2 b	SLCC 2755	Culture
1/2 c	NCTC 5348	Collection
3 a	NCTC 5105	NCTC = National
3 b	SLCC 2540	Collection
3 c	SLCC 2479	of Type
4 ab	NCTC 10528	Cultures
4 a	NCTC 5214	SLCC = Special
4 b	NCTC 10527	<i>Listeria</i>
4 c	ATCC 19116	Culture
4 d	NCTC 1088	Collection
4 e	ATCC 19118	
5 (<i>L. ivanovii</i>)	ATCC 19119	
7	SLCC 2482	

Zur Erhaltung der Stämme wurden diese regelmäßig im Abstand von 8 bis 14 Tagen auf Blutagarplatte subkultiviert, bei 37° C 24 h bebrütet und im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Eine regelmäßige Kontrolle erfolgte durch Färbungen und mikroskopische Untersuchungen.

3.1.3 Immunhistologie

3.1.3.1 *Listeria monocytogenes*-Antiserum vom Kaninchen

3.1.3.1.1 Herstellung

Es wurden ein polyvalentes OH-Antiserum aus den Serotypen 1/2 b (SLCC 2755), 3 c (SLCC 2479), 4 ab (NCTC 10528), 4 b (NCTC 10527) und 7 (SLCC 2482), und ein bivalentes Antiserum mit den Serotypen 1/2 b (SLCC 2755) und 4 b (NCTC 10527) hergestellt.

Die Herstellung der Antigene erfolgte nach der Methode von SEELIGER (1961). Der Keimgehalt der Antigensuspensionen war durch vegetativ aerobe Gesamtkeimzahlbestimmung mittels des Tropfplatten-Verfahrens auf Blutagarplatte festgestellt worden (Amtl. Sammlung § 35 LMBC, 1987). Anschließend wurde die Dichte durch entsprechende Verdünnung der jeweiligen Antigensuspension mit PBS, pH 7,2 auf $0,5 \times 10^9$ Keime/ml eingestellt.

Für die Herstellung des polyvalenten Antiserums standen erwachsene, männliche Neuseeländerkaninchen zur Verfügung. Die Tiere erhielten in drei- bis viertägigem Abstand intravenös steigende Dosen des formalinabgetöteten Mischantigens. Die anfängliche Dosis bestand aus 1 ml Antigensuspension aus den 5 o.g. Antigenen mit je 0,2 ml.

Diese Dosis erhöhte sich jeweils um 0,5 ml, bis 5 ml erreicht waren. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet.

Für die Erzeugung des bivalenten Antiserums erhielten die verwendeten erwachsenen, weiblichen Sachsengoldkaninchen intravenös im Abstand von 4 Tagen drei Injektionen des formalininaktivierten Antigens mit einer Dichte von $0,5 \times 10^9$ Keimen/ml. Bei der ersten Immunisierung betrug die Dosis 1 ml, bei der zweiten 2 ml und bei der dritten 3 ml. Anschließend wurden die Kaninchen viermal in zehntägigen Abständen intravenös mit lebenden Listeriensuspensionen weiterimmunisiert.

Die Dosis betrug jeweils 1 ml bei einer Dichte von 10^5 Bakterien/ml. Bei der fünften und letzten Immunisierung wurde 1 ml mit einer Dichte von $3,5 \times 10^7$ Keimen/ml.

3.1.3.1.2 Antikörpertiterbestimmung

Die Titerbestimmung der Kaninchenserum auf Antikörper gegen *Listeria monocytogenes* erfolgte mittels der Röhrenagglutination (SEELIGER, 1961):

Zur Untersuchung des polyvalenten Antiserums wurden die zur Immunisierung verwendeten Antigene eingesetzt. Die Konzentration der Antigensuspensionen betrug $0,5 \times 10^9$ Keime/ml.

Von dem zu untersuchenden Serum wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (Faktor 2) mit gepufferter isotonischer Kochsalzlösung (PBS = phosphate buffered 0,85 % saline), pH 7,2, in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml angelegt. Zu 0,5 ml der jeweiligen Serumverdünnung kamen 0,5 ml Antigensuspension. Als Positiv-

Kontrolle dienten käufliche Listeria-Kontrollsera Anti-H und Anti-O (Behringwerke). Entsprechende Negativkontrollen mit 0,5 ml PBS und 0,5 ml Antigen-suspension wurden ebenfalls mitgeführt.

Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 50° C jeweils 3 h und 18 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 3 h und 15minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur und nach 18 h und 1 - 2stündigem Stehenlassen bei 4° C.

Für die Untersuchung des bivalenten Antiserums kamen käufliche Listeria-Suspensionen der Typen 1:H, 1:O, 4b:H und 4b:O (Behringwerke) zur Anwendung.

3.1.3.1.3 Ergebnisse

Bei keinem der verwendeten Antigene konnte eine spontane Eigenagglutination beobachtet werden.

Vor der Immunisierung lag der Serumtiter gegen L. m. bei allen Kaninchen unter 1:40. Nach Abschluß der Immunisierung wiesen die Antiseren folgende Serumtiter auf:

I. Polyvalentes Serum:

Agglutinationstiter gegen	Serotyp	K I	K II
	1/2 b	1:2560	1:2560
	3 c	1:1280	1:5120
	4 ab	1:1280	1:2560
	4 b	1:2560	1:5120
	7	1:2560	1:2560

II. Bivalentes Serum:

Agglutinationstiter gegen	Serotyp	K III	K IV
	1:O	1:640	1:2560
	1:H	1:2560	1:10240
	4 b:O	1:10240	1:2560
	4 b:H	1:2560	1:5120

Die Antigenkontrollen waren in allen Ansätzen negativ. Die positiven Kontrollen ergaben sowohl bei Anti-H- als auch Anti-O-Serum bis zur Serumverdünnung 1:1280⁺⁺ positive Reaktion.

3.1.3.1.4 Spezifitätskontrollen:

Wie spezifisch die gewonnenen Antiseren reagieren, konnte man mittels der PAP-Technik und der indirekten Immunofluoreszenz ermitteln. Dazu wurden hitzefixierte Ausstriche von Reinkulturen verschiedener grampositiver und gramnegativer Keime sowie der verschiedenen Serotypen von *L. m.* gefärbt. Die Kulturen waren jeweils 24 h bei 37° C auf Blutagarplatte bebrütet worden.

Keine oder nur sehr dezente Farbreaktionen bzw. Fluoreszenz zeigten bei beiderlei Antiseren *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes* und *Pasteurella multocida*. Deutlich positiv reagierten *Staphylococcus aureus* und β -hämolyisierende Streptokokken. Durch das polyvalente Antiserum konnten alle serologischen Typen von *L. m.* angefärbt werden. Dagegen reagierten bei Verwendung des bivalenten Antiserums die Serotypen 3 a, 3 c, 4 c und 7 nur schwach, während alle übrigen serologischen Typen von *L. m.* sich deutlich anfärbten. Bei Negativkontrollen mit negativem Kaninchenserum färbten sich *Staphylokokken* und *Streptokokken* an, die anderen verwendeten Keime zeigten keine Reaktion.

Die Ergebnisse der mittels PAP-Methode gefärbten Präparate waren mit denen der indirekten Immunofluoreszenz identisch.

3.1.3.1.5 Beseitigung von Kreuzreaktionen

Zur Ausschaltung der Kreuzreaktionen mit Staphylokokken und Streptokokkenantigenen mußten die Antiseren mit hitzeinaktivierten Antigenen der kreuzreagierenden Stämme versetzt werden (SEELIGER, 1961).

Nach zweimaliger Absorption färbten sich die Staphylococcus aureus-Stämme bei beiderlei Antiseren auch bei geringer Serumverdünnung (1:50) nicht mehr an.

Durch alleinige Verdünnung des nichtabsorbierten Antiserums über 1:2000 konnten die Kreuzreaktionen mit Staphylococcus aureus bei Anwendung der PAP-Technik ebenfalls beseitigt werden, während β -hämolisierende Streptokokken selbst in Verdünnungsstufen von 1:20 000 sowohl bei absorbiertem als auch nichtabsorbiertem Antiserum noch deutliche Farbreaktionen zeigten. Bei Anwendung der indirekten Immunofluoreszenz verschwanden die Staphylokokken-Reaktionen ab einer Serumverdünnung von 1:100.

Da Streptokokken auch bei Negativkontrollen mit negativem Kaninchenserum und mit Pufferlösung (TBS) positiv reagierten, wurden weitere Kontrollen an luftgetrockneten und hitzefixierten Streptokokken-Ausstrichen durchgeführt:

	Inkubation mit	Ergebnis
I	3 % H_2O_2 -Lösung und AEC-Substrat	negativ
II	nur AEC-Substrat	negativ
III	3 % H_2O_2 -Lösung, PAP-Komplex, AEC-Substrat	positiv
IV	PAP-Komplex, AEC-Substrat	positiv

Es handelt sich also bei diesen Kreuzreaktionen nicht allein um Antigengemeinschaften zwischen L. m. und Streptokokken, wie sie von mehreren Untersuchern fest-

gestellt wurden (SEELIGER, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; POTEL, 1968; AMTSBERG, 1980; POTEL et al., 1982). Vielmehr zeigt sich, daß Streptokokkenantigene eine Affinität zum Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex besitzen, da schon alleinige Inkubation von PAP-Komplex und AEC-Substrat eine Farbreaktion ohne die Anwesenheit von Antiserum ergibt. Es erklärt ferner, weshalb die Kreuzreaktionen trotz zweimaliger Absorption mit Streptokokkenantigenen und trotz hoher Serumverdünnungen bestehen blieben.

3.1.3.1.6 Anwendung der Antiseren

Die Listeria-Antiseren wurden vor der Anwendung trotz der beschriebenen Kreuzreaktionen nicht mit den kreuzreagierenden Antigenen absorbiert, da Kokken aufgrund der Morphologie in histologischen Schnitten ohne weiteres von Listerien-Stäbchen zu unterscheiden sind.

Um die höchste Intensität an spezifischer Färbung und möglichst niedrige unspezifische Hintergrundfärbungen zu erhalten, mußten in Vorversuchen die optimalen Verdünnungsstufen der Antiseren ermittelt werden. Durch höhere Verdünnung gingen auch die Kreuzreaktionen mit Staphylokokken zurück. Die Verdünnung mit TBS (= Tris buffered saline) bei PAP-Technik und PBS bei Immunfluoreszenz erfolgte jeweils vor Gebrauch.

Bei indirekter Immunfluoreszenz brachte eine Serumverdünnung von 1:100 die besten Ergebnisse. Bei Anwendung der PAP-Technik wurde zumeist mit einer Verdünnungsstufe von 1:1000 gearbeitet. Gute Ergebnisse konnten auch noch mit Verdünnungen bis 1:3000 erzielt werden, wobei sich jedoch die Inkubationszeit verdoppelte.

In der Avidin-Biotin-Technik betrug die Immunserum-verdünnung 1:500.

3.1.3.2 Immunohistochemische Färbetechniken

Um die Brauchbarkeit der Immunofluoreszenztechnik und der Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP) -Technik in der Diagnostik der Listeriose zu überprüfen, wurden beide Methoden erst an Reinkulturen von *L. monocytogenes*, dann an Abklatschpräparaten, Gefrierschnitten, Kryostatschnitten und Paraffinschnitten angewendet und verglichen. Zusätzlich wurde die Avidin-Biotin-Technik (ABC-Peroxidase-Technik) an Paraffinschnitten erprobt. Die PAP-Färbung konnte bei fast allen histologisch und/oder bakteriologisch positiven Fällen (63 Rinder, 14 Schafe, 3 Ziegen) an Kryostatschnitten durchgeführt werden.

Je nach Vollständigkeit und Erhaltungszustand der eingelieferten Gehirne verbrachte man für die immunohistochemischen Untersuchungen jeweils eine Scheibe vom Mesencephalon, vom Myelencephalon möglichst im Bereich der Brücke und von der Medulla oblongata in eine Petrischale.

In einigen Fällen waren nur Teile des Mittelhirns vorhanden. Die Petrischalen wurden mit Isolierband umhüllt, um Austrocknungen zu vermeiden, und bei -20° C eingefroren.

Wenige immunhistologische Untersuchungen konnten an frischem, nativem Material durchgeführt werden. Bei einem Teil der Gehirne wurden im Bereich der Pons an frischem Material Abklatschpräparate angefertigt. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierpathologie der Universität München konnte zusätzliches Material listeriose-positiver Rinder aus dem dortigen Sektionsgut in die

Untersuchungen miteinbezogen werden.

3.1.3.2.1 Indirekte Immunofluoreszenz

Die Durchführung erfolgte nach einer Arbeitsvorschrift der Biologischen Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich (Einführung in die Immunfluoreszenz) und nach Angaben von KHAN und Mitarbeiter (1977):

Waschen mit PBS, pH 7,4	10 min.
Lufttrocknen	15 min.
Überfluten der Präparate mit Listeria-Anti-serum 1:100	30 min.
Spülen in PBS	3 x 5 min.
Spülen in Aqua dest.	2 min.
Lufttrocknen	15 min.
Überschichten mit Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat 1:30	30 min.
Spülen in PBS	3 x 5 min.
Spülen in Aqua dest.	2 min.
Lufttrocknen	30 - 60 min.
Einbetten in Glyzerinpuffer, pH 7,4 (3 Teile Trispuffer + 1 Teil Glyzerin)	

Alle Arbeitsgänge wurden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Verdünnungen erfolgten jeweils mit PBS, pH 7,4.

Daten für das Immunofluoreszenz-Mikroskop (ZEISS):

Okular	10 x
Objektiv	63 x
Quecksilberhochdrucklampe HBO	50 Watt
Filtersatz: Erregerfilter	BP 450/490
Farbteiler	FT 510
Sperrfilter	LT 515

3.1.3.2.2 Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP) -Technik

Nach Angaben von STERNBERGER et al. (1970), BOURNE (1983) und NADJI und MORALES wurde die ungekoppelte PAP-Immunohistochemie wie folgt durchgeführt:

1. Inaktivierung der endogenen Peroxidase: 20 min.
0,5 % H_2O_2 in Methanol, jeweils frisch angesetzt
2. Spülen in Aqua dest. kurz
3. TBS-Pufferbad: (jeweils frisch) 2 x 5 min.
überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abtupfen
4. Inkubation mit NSS (normales Schweine-serum) 1:10 20 min.
5. Dekantieren des NSS, Auftragen des 30 min.
primären Antiserums. Hierfür wurde das
Listeria monocytogenes-Antiserum 1:1000
in TBS verdünnt und 10 % Schweineserum
zugefügt.
6. Dekantieren, Spülen wie unter 3.
7. Inkubation des sekundären Antiserums 30 min.
(Schweine-Anti-Kaninchen-Ig) 1:50
8. Dekantieren, Spülen wie unter 3.
9. Auftragen des PAP-Komplexes vom 30 min.
Kaninchen, 1:50
10. Dekantieren, Spülen wie unter 3.

11. Auftragen von AEC- (3-Amino-9-Ethyl-carbazole) -Substratlösung mit 0,01 % H_2O_2 in 0,1 M Azetatpuffer, pH 5,2 15 min.
12. Dekantieren, Spülen in Aqua dest. 5 min.
TBS-Pufferbad 2 x 5 min.
13. Gegenfärbung in Hämalun 3 min.
Anschließend Bläuen in Ammoniakwasser
(2 ml 17 M NH_3 in 1 Liter Leitungswasser)
durch 10maliges Eintauchen der Schnitte
14. Einschluß in Glyzeringelatine

3.1.3.2.3 Avidin-Biotin-Technik (ABC-Peroxidase-Technik)

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der LMU München durchgeführt, das großflächige 4 μm dicke Paraffinschnitte aus dem Bereich des Myel- und Metencephalons von listeriosepositiven Rindern zur Verfügung stellte.

Reagenzien: Vectastain^R ABC-Kit (Standard)
Färbeanleitung: Vectastain^R ABC-Peroxidase-Methode:

1. Schnitte deparaffinieren in Xylol und hydratisieren durch absteigende Alkoholreihe
2. Waschen mit PBS, 10 mM, pH 7,2 - 7,5
3. Blockieren der endogenen Peroxidase mit 0,03 % H_2O_2 in PBS bei Raumtemperatur
4. Waschen mit PBS
5. Inkubation mit verdünntem Normalserum, 20 min.
bei Raumtemperatur

6. Überschüssiges Normalserum mit Filterpapier absaugen, nicht waschen
7. Inkubation mit 1:5000 verdünntem Primärantikörper 60 min.
8. Zweimaliges Waschen mit PBS
9. Inkubation mit 50 mM α -Methyl-D-Mannosid, 10 min. bei 37° C
10. Zweimaliges Waschen mit PBS
11. Inkubation mit biotiniliertem Antikörper, 30 min. bei Raumtemperatur
12. Dreimaliges Waschen mit PBS
13. Inkubation mit Vectastain-ABC-Reagenz, 30 min. bei Raumtemperatur
14. Dreimaliges Waschen mit PBS
15. Inkubation mit AEC-Peroxidase Substrat, 10 min. bei Raumtemperatur, Waschen mit PBS
16. Gegenfärben mit Hämalaun, bläuen in Ammoniakwasser
17. Eindecken mit Glyzeringelatine

3.1.3.3 Listeria-Reinkultur-Ausstriche

Ausstriche von *L. monocytogenes*-Reinkulturen wurden mit indirekter Immunofluoreszenz und PAP-Methode immunserologisch gefärbt. Mit steriler physiologischer Kochsalzlösung wurden von 24 h alten *L. m.*-Referenzstämmen der Serotypen 1/2 a und 4 b dünne Ausstriche auf 76 x 26 mm Objektträger angefertigt und luftgetrocknet. Die Fixierung erfolgte durch Hitze (Bunsenflamme), kaltes Azeton (10 min.) oder 96 % Äthanol (10 min.).

Ausstriche von Reinkulturen dienten bei den immuno-histochemischen Präparatfärbungen jeweils als Positivkontrolle.

3.1.3.4 Abklatschpräparate

Die Präparate stammten von histologisch positiven und negativen sowie bakteriologisch positiven und negativen Rindergehirnen. Von tiefgefrorenem Gehirnmateriale des Mittel- oder Rautenhirnes wurde mit einem in der Bunsenflamme abgeflamten Messer eine frische Schnittfläche zurechtgeschnitten und anschließend das Material bei Raumtemperatur aufgetaut. Auf 76 x 26 mm Glasobjektträgern wurden mehrere möglichst dünne Abklatschpräparate durch mehrmaliges Betupfen des Gehirnmateriale angefertigt. Die ersten drei Präparate mußten verworfen werden, erst die folgenden waren für die immunhistologischen Untersuchungen geeignet. In einigen Fällen kam für den Abklatsch frisches Gehirnmateriale zur Untersuchung. Die Präparate wurden eine Stunde luftgetrocknet und anschließend in kaltem Azeton von 4° C 10 Minuten fixiert.

Für Untersuchungen mit indirekter Immunofluoreszenz wurden auch einige Präparate hitzefixiert (dreimaliges vorsichtiges Ziehen der Objektträger durch die Bunsenflamme).

3.1.3.5 Gefrierschnitte

Hierfür wurde in 6%igem Formalin fixiertes Gewebe des Hirnstammes im Bereich der Pons oder der Medulla oblongata nach der in 3.1.1.2 beschriebenen Methode geschnitten. Neben histopathologisch veränderten Gehirnen von Rindern und Schafen kamen auch unver-

änderte Gehirne als Negativkontrollen zur Untersuchung.

Zur besseren Haftung der Schnitte mußten sie auf Objektträgern, die mit Chromalaun-Gelatinelösung beschichtet waren, aufgezogen werden. Die Vorbereitung sowie das Beschichten der Objektträger ist in Kapitel 3.1.5 h dargestellt. Die Schnitte wurden 24 h bei Zimmertemperatur getrocknet, anschließend 10 Minuten in kaltem Azeton fixiert und mittels indirekter Immunofluoreszenz- und PAP-Technik untersucht.

3.1.3.6 Kryostatschnitte

Tiefgefrorenes Gehirnmateriale aus dem Bereich von Mittelhirn, Pons oder Medulla oblongata wurde im Kryostat (Fa. SLEE, Mainz) bei -20°C geschnitten, auf unbeschichtete Objektträger angeheftet und eine Stunde lang bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Für die PAP-Färbung erfolgte die Fixierung entweder in kaltem Azeton bei 4°C 10 Minuten oder allein durch das Methanol/ H_2O_2 -Bad bei der Blockierung der endogenen Peroxidase. Für die indirekte Immunofluoreszenztechnik schien eine Fixierung in 96%igem Äthanol für 10 Minuten am günstigsten.

Die Einflüsse von Schnittstärke, Objektträgerreinigung, Fixierung, Schweineserum, Sterilfiltrierung von Reagenzien, Waschzeiten und Substratkonzentration bei der PAP-Färbung wurden an einigen Präparaten von histologisch und bakteriologisch positiven Rindergehirnen untersucht. Nach Optimierung der PAP-Färbetechnik konnte die Mehrzahl der gesammelten Fälle nach dieser Methode bearbeitet werden.

3.1.3.7 Paraffinschnitte

Der L. monocytogenes-Antigennachweis erfolgte an Paraffinschnitten mittels PAP-Methode und ABC-Peroxidase-Methode. Zur Untersuchung lagen eine oder mehrere Lokalisationen des Hirnstammes vor. Die Fixierungsdauer in 10%igem Formalin betrug über 48 Stunden, in vielen Fällen mehrere Wochen. Die Proben wurden über die aufsteigende Alkoholreihe (ca. 25° C) mit Histosol als Intermedium in reines Paraffin (56 - 58° C) in einem Einbettautomaten eingebettet und von den eingebetteten Gewebsblöcken 4 µm dicke Schnitte hergestellt.

a) PAP-Färbung

Die Schnitte sollten in reines Paraffin eingebettet werden, da andere Einschlußmedien häufig nicht vollständig entfernt werden können und dadurch Anlaß für unspezifische Färbungen geben (BOURNE, 1983). Paraffinschnitte wurden wie folgt entparaffiniert:

1. Brutschrank (nicht über 58 - 60° C!) 30 min.
2. Sofortiges Überführen in frisches Xylol-Bad, einmal wechseln 2 x 3 min.
3. Zweimaliges Bad aus absolutem Alkohol 2 x 3 min.
4. Zweimaliges Bad aus 96 % Alkohol 2 x 3 min.
5. Beginn der PAP-Färbung mit Inaktivierung der endogenen Peroxidase in Methanol/H₂O₂-Bad

Nach dem Gegenfärben und Bläuen der Schnitte wurden diese in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, dann in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckt.

b) ABC-Färbung

Siehe Avidin-Biotin-Technik (3.1.3.2.3).

3.1.3.8 Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrolle dienten einmal Ausstriche von L. m.-Reinkulturen der Serotypen 1/2 a und/oder 4 b (3.1.3.3). Desweiteren wurde in einigen Fällen eine Aufschwemmung von L. m.-Serotyp 4 b mit einer Öse vorsichtig auf die Kontrollschnitte streifenförmig ausgestrichen. Als Aufschwemmungsflüssigkeit war sterile physiologische NaCl-Lösung geeignet.

Negative Kontrollen erfolgten jeweils unter Ersatz des Listeriaantiserums durch entsprechend verdünntes negatives Kaninchenserum. Ein zweites Präparat eines histologisch negativen Gehirnes wurde mit Listeria-antiserum inkubiert.

3.1.4 Anamnese

In 62 Fällen, bei denen die routinemäßige histologische Untersuchung des Gehirnes das Vorliegen einer gemischtzelligen, vorwiegend eitrigen Hirnstammenzephalitis ergeben hatte, konnten genaue Vorberichte erhoben werden. Das Erstellen der Anamnese erfolgte durch Befragen der Besitzer, sowie durch eigene Begutachtung von Haltung und Fütterung. Bei Silagefütterung wurden jeweils ca. 500 g Probenmaterial des Silofutters entnommen, grobsinnlich beurteilt und eine pH-Wert-Messung durchgeführt.

3.1.4.1 pH-Wert-Messung in Silageproben

Von den Silageproben, die aus listeriosepositiven Betrieben stammten, wurde durch manuelles oder

mechanisches Auspressen mit einer Haushaltspresse Saft gewonnen und in einer Petrischale aufgefangen. Der pH-Wert wurde mit einem elektronischen pH-Meter (WTW, Weilheim) ermittelt. Bei relativ hohem Trockensubstanzgehalt der Proben, vor allem bei Grassilage, mußte der pH-Wert direkt im Silierfutter an mehreren Stellen des Probenmaterials gemessen werden. Aus den einzelnen Meßwerten einer Probe wurde ein Mittelwert gebildet.

3.1.5 Lösungen für die Immunhistologie

- a) Irispuffer 0,05 M, pH 7,6:
6,1 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan werden in 50 ml Aqua dest. gelöst, mit 37 ml 1 N HCl versetzt und auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert sollte $7,6 \pm 0,2$ bei 25° C betragen.
- b) IBS (Iris buffered saline):
100 ml 0,05 M Irispuffer, pH 7,6
900 ml 0,85 % NaCl-Lösung
- c) Physiologische Kochsalzlösung, 0,85 %:
8,5 g Natriumchlorid (NaCl)
1000 ml Aqua dest.
- d) PBS (Phosphate buffered saline), 0,01 M, pH 7,2:
1,48 g Natriumhydrogenphosphat
0,43 g Kaliumhydrogenphosphat
7,2 g Natriumchlorid
in 1000 ml Aqua dest. lösen
- e) AEC-Substratlösung:
4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)
in 1 ml N,N-Dimethylformamide lösen,
14 ml 0,1 M Azetatpuffer, pH 5,2 zugeben
0,15 ml 3 % H_2O_2 -Lösung zugeben

f) Azetaldipuffer: 0,1 M, pH 5,2:

210 ml 0,1 N Essigsäure

790 ml 0,1 M Natriumazetat

g) Hämalaun-Lösung (saures Hämatoxylin nach Mayer):

1 g Hämatoxylin

0,2 g Natriumjodat

50 g Kalialaun

50 g Chlorhydrat

1 g Zitronensäure

1000 ml Aqua dest.

h) Chromalaun-Gelatine-Lösung:

Vorbereitung der Objektträger:

Reinigung der Objektträger über Nacht in 4 % NaOH, danach gründliches Spülen in fließendem Leitungswasser, kurz in 2 % HCl neutralisieren, wiederum gründlich in Leitungswasser spülen. Anschließend in erwärmte (60° C) Chromalaun-Gelatine-Lösung tauchen und mehrere Stunden im Brutschrank (37° C) trocknen lassen.

Chromalaun-Gelatine-Lösung:

6,75 g Gelatine

1500 ml Aqua dest.

58 ml 4 % Chromalaun (Kalium-Chrom-III-Sulfat)

Einige Thymolkristalle

3 - 5 Tropfen Detergens (Pril)

Die Gelatine wird bei 60° C gelöst, anschließend auf 50° C abgekühlt und Chromalaun-Lösung, Thymol und Detergens hinzugefügt.

5.1.6 Lösungen für die Nissl-Färbung

Cresylechtviolett	1,0 g
Natriumacetat	0,21 g
Aqua bidest.	1000 ml
Eisessig	3 ml

pH-Wert etwa 3,5. Der Farbstoff muß handwarm gelöst werden. Nach dem Erkalten filtrieren und ca. 1 Tag reifen lassen.

3.1.7 Medien und Reagenzien für die Bakteriologie

A. Anreicherungsmedium

a) Basisnährboden

Trypticase Soya Broth (Oxoid CH 129)	30 g
Hefeextrakt (BBL 11929)	6 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,3

Nach Fertigstellung der Lösung wurden je 225 ml in sterile Glaskolben abgefüllt und bei 121° C für 15 Minuten autoklaviert.

b) Supplement 1

Acriflavin (Sigma A 8251)	15 mg
Nalidixinsäure (Sigma N 4382)	40 mg
Aqua dest.	10 ml
Die Lösung wurde sterilfiltriert (Millipore 0,22 µm)	

c) Supplement 2

Cycloheximid (Sigma C 6255)	50 mg
Ethanol	4 ml
Aqua dest.	6 ml
Die Lösung wurde sterilfiltriert (Millipore 0,22 µm)	

d) Fertiger Nährboden

Basisnährboden und Supplemente wurden getrennt aufbewahrt und erst unmittelbar vor dem Ansatz gemischt, indem von den Supplementlösungen jeweils 2,5 ml zu 225 ml Basisnährboden zugesetzt wurden.

B. Nachweismedium (modifizierter Mc Bride-Agar)

a) Basisnährboden

Phenylethanolagar (Difco 0504-05-6)	35,5 g
Clycin (Sigma G 7251)	10 g
Lithiumchlorid (Sigma L 0505)	0,5 g
Aqua dest.	1000 ml

Die Lösung wurde in Flaschen zu 100 ml abgefüllt, bei 121° C/15 Minuten autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Supplement

Cycloheximid	200 ml
Ethanol (absolut)	4 ml
Aqua dest.	6 ml

c) Fertiger Nährboden

Basisnährboden wurde im Dampftopf verflüssigt und auf 45° C abgekühlt. Zu jeweils 100 ml wurde 1 ml Supplement zugesetzt, gut gemischt und auf Petri-Platten gegossen.

C. 0,5 % KOH-Lösung

KOH	500 mg
Aqua dest.	100 ml

Die Lösung wurde in Glasröhrchen zu 9 ml abgefüllt und bei 121° C/15 Minuten autoklaviert.

D. Blutagar

Es wurde der übliche Rinderblutagar verwendet.

E. a) SIM-Medium

SIM-Nährboden (Oxoid CM 435)	30 g
Hefeextrakt (BBL 11929)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

Nährboden und Hefeextrakt wurden gelöst, zu 6 ml in Glasröhrchen abgefüllt und bei 121° C/15 Minuten autoklaviert.

b) Kligler-Medium:

Kligler Iron Agar (Difco 0086-01)

f. 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung für Katalasetest

g. Kulturmedium (flüssig)

Trypticase Soya Broth (BBL 11768)	30 g
Hefeextrakt (BBL 11929)	6 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,3

Die Lösung wurde zu je 6 ml in Glasröhrchen abgefüllt und bei 121° C/15 Minuten autoklaviert.

H. Fermentationstest

a) Basisnährboden

Purple Broth Base (Difco 0227-01-6)	16 g
Aqua dest.	900 ml

b) Kohlenhydrate

Rhamnose (Sigma R 3875)
Glukose (Merck 8342)
Dulzit (Sigma D 0256)
Xylose (Sigma X 1500)
Salizin (Sigma S 0625)
Mannit (Merck 5982)

Je 5 g wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst und sterilfiltriert (Millipore 0,22 µm)

c) Fertiger Nährboden

9,2 ml Purple Broth Base (blau) wurden in Glasröhrchen mit Durham-Röhrchen abgefüllt und bei 121° C/15 Minuten autoklaviert. Danach wurde 1 ml der jeweiligen Kohlenhydrat-Stammlösung zugegeben und einen Tag gelagert, um eine vollständige Durchmischung zu sichern.

5.1.8 Chemikalien und Bezugsquellen

Behringwerke AG, Marburg:

Listeria-Suspensionen:	Typ 1:H	ORGH 40/41
	Typ 1:0	ORGF 40/41
	Typ 4b:H	ORGI 40/41
	Typ 4b:0	ORGG 40/41
Listeria Control Serum Anti-O positiv		ORFV 04/05
Listeria Control Serum Anti-H positiv		ORFW 04/05

DAKO-Immunglobulins, DAKOPATIS (DAKO) GmbH, Hamburg:

PAP-Kit System 40	K 548
Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobulin	Z 196
Peroxidase-konjugierte-Schweine-Anti-Kaninchen-Immunglobuline	P 217

D. Kindler GmbH & Co., Freiburg i. Br.:

Eukitt	B 18
--------	------

E. Merck, Darmstadt:

Ammoniaklösung 25 % p. a.	5432
Äskulin	848
Äthanol absolut p. a.	972
Azeton p. a.	14
Chloralhydrat	DAB 7 2425
Cresylechtviolett	5235
Eosin gelblich	1345
Essigsäure 100 % p. a.	63
Formaldehydlösung mind. 37 % säurefrei	3999
Gelatine gepulvert	4078
Glycerin (Glycerol), etwa 87 % reinst	4091
Hämatoxylin	4305

Kaliumaluminiumsulfat p. a.	1047
Kaliumchrom (III) -Sulfat	1036
Kaliumhydroxid-Plättchen p. a.	5033
Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	5099
Methanol reinst.	6008
Natriumjodat p. a.	6525
Natriumacetat-Trihydrat p. a.	6267
Natriumchlorid krist. reinst	6400
Natriumhydrogenphosphat	6589
Paraffin Blockform	7159
Perhydrol ^R , 30 % H ₂ O ₂ p. a.	7210
2-Propanol (Isopropylalkohol) reinst	995
Salzsäure mind. 32 % p. a.	319
Tris (hydroxymethyl) -aminomethan	LAB 8382
Xylol reinst	8685
Zitronensäure p. a.	244
<u>Nordic, Niederlande:</u>	
Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat	
<u>Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover:</u>	
Thymol krist.	DAB-6 78337
<u>SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg:</u>	
Glyzeringelatine	23310
<u>SHANDON GmbH, Frankfurt:</u>	
Histosol	S 691
<u>SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen:</u>	
3-Amino-9-Ethylcarbazole	A-5754
N.N-Dimethylformamide	D-4254
<u>Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA:</u>	
Vectastain ABC Kit (Standard)	PK-4000

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Histologie

3.2.1.1 Histologische Befunde

Histologische Veränderungen im Gehirn wurden als listeriosepositiv beurteilt, wenn eine gemischt-zellige, überwiegend eitrige Meningoenzephalitis vorlag, die auf den Hirnstamm beschränkt war. Die routinemäßige histologische Untersuchung der Gehirne von 183 Rindern, 29 Schafen und 3 Ziegen ergab bei 45 Rindern, 15 Schafen und 3 Ziegen das Vorliegen einer Hirnstammenzephalitis vom Listeriostyp. Bei 3 Rindern, bei denen die untersuchten Veränderungen nicht eindeutig einer Listerienenzephalitis zugeordnet werden konnten (vorwiegend nicht-eitrige Enzephalitis), wurden die Gehirne am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der LMU München an verschiedenen Lokalisationen nachuntersucht. Dabei sprachen die histologischen Befunde in zwei Fällen, bei denen auch l. m. isoliert werden konnte, für das Vorliegen einer Listerieninfektion. Beim dritten Fall handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Virusinfektion. Hierbei war auch die bakteriologische Untersuchung negativ verlaufen.

Von den übrigen 150 routinehistologisch unauffälligen Gehirnen konnten aus 25 Rindergehirnen und aus 3 Schafgehirnen Listerien bakteriologisch isoliert werden. Aufgrund dessen wurden diese 28 histologisch negativen, aber bakteriologisch positiven Gehirne am Münchner Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie in allen Hirnregionen nochmals durch großflächige transversale Paraffinschnitte untersucht. Davon wiesen 9 Rindergehirne im Hirnstammbereich immunozytäre Reaktionen auf: In 5 Fällen lagen nur vereinzelte perivaskuläre

lympho-monozytäre oder granulomartige Reaktionen vor, die anderen 4 Fälle zeigten dagegen deutliche Erscheinungen einer Listerienenzephalitis. Mit der Nisslfärbung konnten Listerien in keinem Fall histologisch nachgewiesen werden. Die restlichen untersuchten Gehirne waren ohne pathologischen Befund.

Somit wurden histologisch insgesamt 74 Tiere (56 Rinder, 15 Schafe und 3 Ziegen) als listeriosepositiv beurteilt. 9 Fälle (12,2 %) waren durch die routinemäßige Untersuchung nicht erfaßt worden.

3.2.1.2 Histopathologische Auswertung mittels Nisslfärbung

Die histopathologischen Veränderungen im Gehirn waren bei allen Hauswiederkäuern (Rind, Schaf, Ziege) weitgehend gleich.

Die Häufigkeit der Läsionen in den drei Lokalisationen des Gehirns bei den Hauswiederkäuern ist in Tabelle 6 dargestellt. Fast immer (98,5 %) fanden sich die entzündlichen Reaktionen im Bereich des Rautenhirns, wo sie auch am stärksten in Erscheinung traten. Auch das Mittelhirn war häufig von den Entzündungserscheinungen betroffen, bei kleinen Wiederkäuern fast genauso oft wie das Rautenhirn, beim Rind hingegen nur in etwa 80 %. Bei einem einzigen Tier lag die Infektion ausschließlich im Mittelhirnbereich, im Rautenhirn fehlten histopathologische Veränderungen.

Das Zwischenhirn war zwar insgesamt seltener und stets nur geringgradig verändert, doch wiesen beim Rind immerhin noch ein Viertel, bei der Ziege ein Drittel und beim Schaf sogar zwei Drittel der Tiere in diesem Bereich Entzündungserscheinungen auf. Das Zwischenhirn war jedoch fast nur mitbetroffen, wenn die histopathologischen Veränderungen im Rauten- und Mittelhirn insgesamt stark

(64 %) oder mäßig (32 %) ausgeprägt waren. Nur ein Rindergehirn ließ in allen drei Hirnbereichen lediglich geringgradige Reaktionen erkennen.

Tabelle 6 Häufigkeit histopathologischer Veränderungen in drei verschiedenen Lokalisationsebenen des Gehirns bei zerebraler Listeriose der Hauswiederkäuer

Lokalisation	Häufigkeit der Veränderungen							Gesamt		
	Rind		Schaf		Ziege					
	nv/nu	%	nv/nu	%	nv	nu		nv	nu	%
Rautenhirn	50/51	98,0	13/13	100	2	2	100	65	66	98,5
Mittelhirn	45/55	81,8	13/14	92,9	3	3	100	61	72	84,7
Zwischenhirn	14/56	25,0	10/15	66,7	1	3	33,3	25	74	33,8

nv = Anzahl veränderter Lokalisationen

nu = Anzahl untersuchter Lokalisationen

% = Prozentuale Häufigkeit bezogen auf nu

Wie Tabelle 7 zeigt, waren die Läsionen beim Schaf insgesamt stärker ausgeprägt als beim Rind.

Tabelle 7 Allgemeiner Stärkegrad histopathologischer Veränderungen im Gehirn bei zerebraler Listeriose der Hauswiederkäuer

Stärkegrad	Rind n = 56		Schaf n = 15		Ziege n = 3		Gesamt n = 74	
	nv	%	nv	%	nv	%	nv	%
schwach +	11	19,6	2	13,3	-	-	13	17,6
mäßig ++	29	51,8	4	26,7	2	66,7	35	47,3
stark +++	16	28,6	9	60,0	1	33,3	26	35,1

Die histopathologischen Veränderungen ließen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. Parenchymläsionen

2. Perivaskuläre entzündliche Infiltrate

Wie in Tabelle 8 dargestellt ist, war der Entzündungscharakter granulozytär, monozytär, lympho-monozytär oder granulomatös. In vielen Fällen bestanden die Alterationen aus einer Kombination mononukleärer und granulozytärer Zelltypen (gemischtzelliger Charakter). Durch die Einschmelzung von Nerven- und Stützgewebe traten im Parenchym malazische Herde auf. In etwa 60 % der Fälle kamen dichte herdförmige Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten vor, die nicht selten zu größeren Herden zusammenflossen. Zwischen den eitrigen Entzündungszellen fanden sich häufig Detritusmassen aus eingeschmolzenem Gewebe und zerfallenen Granulozyten. Solche Herde können im Unterschied zu eigentlichen Abszessen nur als "sogenannte Mikroabszesse" bezeichnet werden, da ihnen ein Granulationsgewebe bzw. eine

bindegewebige Abszeßmembran so gut wie immer fehlt. Eine Demarkation vom unveränderten Hirngewebe findet allenfalls in einem peripheren Wall aus Granulozyten und Makrophagen ihren Ausdruck. Bei einem Schaf konnte allerdings im vorderen Teil der Medulla oblongata ein randständiger 5 mal 8 mm großer abszeßartiger Eiterherd mit zentraler Nekrose festgestellt werden. In der Peripherie wurde der Herd durch eine gemischt-zellige Entzündungsreaktion mit beginnender Bindegewebszubildung (pyogenene Membran) abgegrenzt.

Bei den als granulomatös bezeichneten Veränderungen handelte es sich nicht um typische Granulome, die von einem Granulationsgewebe umgeben sind, sondern um unregelmäßig begrenzte, vorwiegend von Monozyten getragene Reaktionsbilder ohne eigentliche Angiofibroblastensprossung. Im Zentrum der Veränderungen waren meist degenerativ-nekrotische Gewebemassen anzutreffen.

Rein granulozytäre Entzündungsprozesse traten fast nur in parenchymalen Schädigungen auf, während im Bereich der Gefäße nur in Einzelfällen neutrophile Granulozyten überwogen. Das häufigste Entzündungsmuster im Parenchym wie perivaskulär war von Granulozyten, Monozyten und/oder Lymphozyten geprägt.

Im Gehirn eines Rindes waren sowohl perivaskuläre als auch parenchymale Veränderungen von zahlreichen eosinophilen Granulozyten durchsetzt.

Tabelle 8 Art der histopathologischen Veränderungen im Gehirn bei zerebraler Listeriose der Hauswiederkäuer

Art der Veränderungen	Rind n = 56		Schaf n = 15		Ziege n = 3		Gesamt n = 74	
	nv	%	nv	%	nv	%	nv	%
Parenchym- läsionen								
granulozytär- fokal (sog. Mikroabszesse	33	58,9	9	60	2	66,7	44	59,5
monozytär- granulozytär	45	80,4	14	93,3	3	100	62	83,8
monozytär	13	23,2	4	26,7	2	66,7	19	25,7
granulomatös	10	17,9	4	26,7	3	100	17	23,0
Malazien	29	51,8	4	26,7	3	100	36	48,6
Perivaskuläre Infiltrate								
granulozytär	1	1,8	2	13,3	-	-	3	4,0
granulo-mono- zytär-(lympho- zytär) (= ge- mischttzellig)	49	87,5	14	93,3	3	100	66	89,2
lympho- monozytär	25	44,6	6	40	-	-	31	41,9

n = Gesamtzahl histologisch positiver Fälle

nv = absolute Häufigkeit der jeweiligen Veränderungen

% = relative Häufigkeit der jeweiligen Veränderungen bezogen auf n

3.2.1.3 Mikroskopischer Nachweis der Bakterien

In der Hälfte aller Fälle konnten in den Gefrierschnitten stäbchenförmige Bakterien mikroskopisch nachgewiesen werden (Tabelle 9). Bei Rindern mit Listeriose gelang der histologische Nachweis nicht so häufig (42,9 %) wie bei den kleinen Wiederkäuern (72,2 %). Die Bakterien kamen fast nur zusammen mit Granulozyten vor, am häufigsten in rein eitrigen herdförmigen Infiltraten. Da diese überwiegend in parenchymalen Läsionen auftraten, konnten auch dort die meisten Listerien gefunden werden. Perivaskulär waren sie nur selten nachweisbar. Die Bakterien lagen extrazellulär in der Nähe von Granulozyten oder intrazellulär phagozytiert in den Granulozyten oder Makrophagen.

Tabelle 9 Nachweishäufigkeit stäbchenförmiger Bakterien in histologisch verändertem Hirngewebe bei der Listerienenzephalitis der Hauswiederkäuer

Art der Veränderungen	Häufigkeit histologisch nachweisbarer Bakterien							
	Rind n = 56		Schaf n = 15		Ziege n = 5		Gesamt n = 74	
	nv	%	nv	%	nv	%	nv	%
parenchymal	17	39,4	5	33,3	2	66,6	24	32,4
parenchymal + perivaskulär	5	8,9	5	33,3	-	-	10	13,5
perivaskulär	2	3,6	1	6,6	-	-	3	4,0
Gesamt	24	42,9	11	73,3	2	66,6	37	50

n = Gesamtzahl histologisch positiver Fälle

nv = absolute Häufigkeit histologisch positiver Fälle mit stäbchenförmigen Bakterien in den jeweiligen Veränderungen

% = relative Häufigkeit bezogen auf n

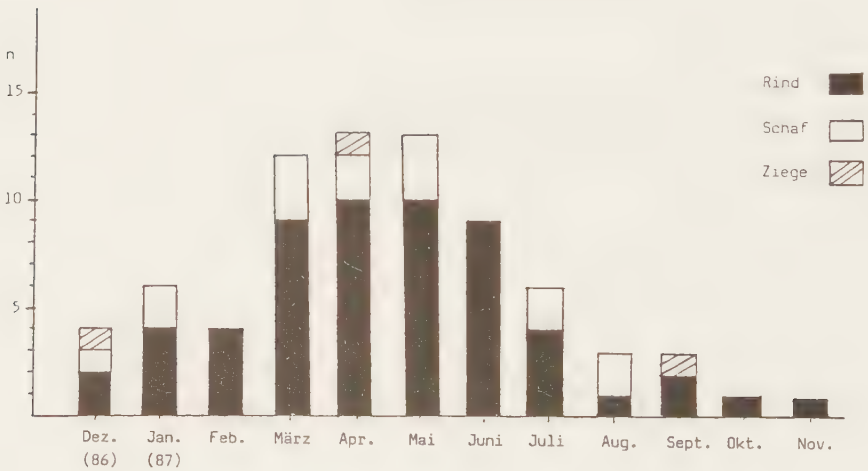
Aus den 37 Gehirnen, bei denen mikroskopisch in den nach Nissl gefärbten Schnitten Bakterien zu sehen waren, konnten durch die kulturelle Untersuchung 29mal *L. monocytogenes*, einmal *L. innocua* und 4mal keine Listerien isoliert werden. Drei Fälle waren bakteriologisch nicht untersucht worden.

Mit PAP-Technik immunhistologisch gefärbte Kryostat-schnitte derselben Gehirne ergaben bei 20 Tieren (64,5 %) ein positives und 11mal (35,5 %) ein negatives Ergebnis. Drei Gehirne waren immunhistologisch nicht untersucht worden, drei weitere Fälle konnten nicht eindeutig beurteilt werden.

3.2.1.4 Monatliche Verteilung der Fälle

Die Häufigkeit histologisch positiver Listeriosefälle weist jahreszeitliche Schwankungen auf (Abb. 4). Die meisten Fälle wurden in der ersten Jahreshälfte festgestellt, wobei der Höhepunkt im April und Mai lag.

Abb. 4 Monatliche Häufigkeit der Listerien-
enzephalitis bei Hauswiederkäuern von
Dezember 1986 bis Dezember 1987



5.2.2 Bakteriologie

Bei Hauswiederkäuern, die wegen zentralnervöser Störungen zur Untersuchung eingeliefert wurden, rangiert das Rind mit 85,9 % der Fälle an erster Stelle. Aus den untersuchten Gehirnen konnte neben *Listeria monocytogenes* in einigen Fällen (6,1 %) auch die als apathogen angesehene Art *Listeria innocua* isoliert werden. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung unabhängig von histologischen Befunden. Bei etwa 30 % der untersuchten Tiere mit zentralnervösen Störungen konnten die Erreger der Listeriose (*L. monocytogenes*) isoliert werden. Bei Schafen waren sogar fast 40 % positiv.

Tabelle 10 Bakteriologische Befunde aus Gehirnen von Hauswiederkäuern mit zentralnervösen Störungen

	Gesamt	Rind	Schaf	Ziege
n	213	183	28	2
%	100	85,9	13,1	1,0
<i>Listeria</i> positiv	78	63	14	1
%	36,6	34,4	50,0	50,0
<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i> positiv	66	54	11	1
%	31,0	29,5	39,3	50,0
<i>Listeria</i> negativ	135	120	14	1
%	63,4	65,6	50,0	50,0
<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i> negativ	147	129	17	1
%	69,0	70,5	60,7	50,0
<i>L. innocua</i>	13*	10*	3	-
%	6,1	5,5	10,7	-

n = Gesamtzahl der untersuchten Fälle

% = relative Häufigkeit bezogen auf n

* = bei einem Rind gleichzeitig *L. monocytogenes* und
L. innocua isoliert

In Tabelle 11 ist die Verteilung der isolierten *Listeria*-Serovarietäten aufgeführt. Bei 78 positiven Fällen konnten 79 Stämme isoliert werden. Von *Listeria monocytogenes* steht der Serotyp 4 b mit 62 % bei weitem an der Spitze. Am zweithäufigsten (11,4 %) ist der Typ 1/2 a vertreten, während andere Serotypen nur vereinzelt oder gar nicht festgestellt werden konnten. 16,4 % aller isolierten *Listerien* erwiesen sich als *Listeria innocua*.

Tabelle 11 Häufigkeit der isolierten Serotypen der Gattung *Listeria* bei Hauswiederkäuern mit zentralnervösen Störungen

Tierart	Listeria-Serotyp							Gesamt
	1/2 a	1/2 b	1/2 c	3 b	4 b	6 a *	6 b *	
Rinder	7	5	1	-	41	3	7	64 **
%	10,9	7,8	1,6	-	64,1	4,7	10,9	100
Schafe	2	1	-	1	7	1	2	14
%	14,3	7,1	-	7,1	50,0	7,1	14,3	100
Ziegen	-	-	-	-	1	-	-	1
%	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt	9	6	1	1	49	4	9	79
%	11,4	7,6	1,3	1,3	62,0	5,0	11,4	100

* = *Listeria innocua*

** = bei einem Rind gleichzeitig 1/2 a und 6 b

Anfangs waren die Gehirnproben nur auf dem Wege der bei 3.1.2.1 beschriebenen Kälteanreicherung bakteriologisch untersucht worden. Als es jedoch gelang, Listerien im Direktausstrich nachzuweisen, wurden die restlichen Proben jedesmal auch diesem Verfahren unterzogen.

Listeria monocytogenes konnte dabei in vielen Fällen bereits nach zwei Tagen isoliert werden (Tabelle 12). Bei über der Hälfte der listeriosepositiven Rindergehirne ließen sich die Erreger schon im direkten Ausstrich erfassen, bei kleinen Wiederkäuern sogar in 77,8 %.

Tabelle 12 Nachweishäufigkeit von *L. monocytogenes* in der Direktkultur

	L. m. positiv und in DK untersucht	DK positiv	%
Rind	43	22	51,2
Schaf	8	6	75,0
Ziege	1	1	100
Total	52	29	55,8

DK = Direktkultur

Zu welchem Zeitpunkt des Untersuchungsverfahrens (nach 2 Tagen in der Direktkultur, nach 11 Tagen in der I. Anreicherung oder nach 16 Tagen in der II. Anreicherung) die Listerien erstmals isoliert werden konnten, ist in Tabelle 13 aufgeführt. Mittels siebentägiger Kälteanreicherung und zweitägiger Bebrütungszeit (I. Anreicherung) gelang der *L. monocytogenes*-Nachweis

beim Rind zu 85,2 %, bei den kleinen Wiederkäuern konnten 83,3 % erfaßt werden. Dagegen wurden durch weitere fünftägige Bebrütung noch 14,8 % (Rind) bzw. 16,7 % (kl. Wdk.) der Erreger ermittelt. *L. innocua* konnte im Direktausstrichverfahren in keinem Fall isoliert werden. Diese Keime erschienen immer erst nach Anreicherung.

Tabelle 13 Zeitpunkt der Erregerisolierung bei der bakteriologischen Untersuchung auf Listerien in Gehirnen von Hauswiederkäuern

Rind	n	Listeria positiv	Listeria negativ	<i>L. m.</i>	<i>L. innoc.</i>
DK	146	22	124	22	-
I. A	183	30*	153	24	7*
II. A	178	11	167	8	3
Gesamt	183	63*	120	54	10*
Schaf					
DK	18	6	12	6	-
I. A	28	6	22	3	3
II. A	27	2	25	2	-
Gesamt	28	14	14	11	3
Ziege					
DK	2	1	1	1	-
I. A	2	-	2	-	-
II. A	2	-	2	-	-

n = Gesamtzahl untersuchter Fälle

DK = Direktkultur

A = Anreicherung

* bei 1 Rind gleichzeitig 6 b u. 1/2 a

In Tabelle 14 wird dargestellt, in welcher der drei untersuchten Lokalisationen (Großhirn, Stammhirn, Medulla oblongata) *L. monocytogenes* auftrat.

In der Hälfte der Fälle standen nicht alle drei Lokalisationsstellen zur Verfügung, so daß entweder nur Großhirn und Stammhirn, Großhirn und Nachhirn oder nur das Stammhirn bakteriologisch untersucht werden konnten. Auffällig ist, daß *L. m.* nicht nur im Bereich des Hirnstammes und des Nachhirns gefunden wurde, wo histologisch die meisten Veränderungen zu finden sind, sondern in fast 50 % der Fälle auch im Großhirn. Hierbei muß allerdings eingeräumt werden, daß bei den Proben aus dem Großhirnbereich häufig auch Teile des Zwischenhirns mit dabei waren. Bei 15,2 % konnte *L. m.* nur aus der Medulla oblongata, bei 22,7 % nur aus dem Stammhirn isoliert werden. Zu 74,2 % fanden sich die Erreger im Hirnstammbereich.

Tabelle 14 Lokalisationsstellen isolierter Listerien

Tierart	Vorhandenes Untersuchungsmaterial				L. m.-positive Lokalisationen							
	1,2,3	1,2	1,3	3	1	2	3	1,2	1,3	2,3	1,2,3	
Rind	27	4	21	2	3	10	15	2	10	8	6	
Schaf	5	2	4	-	-	-	-	2	4	1	4	
Ziege	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Total	33	6	25	2	3	10	15	4	14	9	11	
%	50,0	9,1	37,9	3,0	4,5	15,2	22,7	6,0	21,2	13,6	16,7	

1 = Großhirn

2 = Medulla oblongata

3 = Stammhirn

3.2.3 Vergleich zwischen Histologie und Bakteriologie

Etwa 78 % der Tiere mit nachweisbaren histologischen Veränderungen erwiesen sich bei der kulturellen Untersuchung auf *L. monocytogenes* als positiv (Tabelle 15).

Tabelle 15 Vergleich Histologie/Bakteriologie

IA	Total	Hist. positiv		L. m. positiv	%
Rind	183	56	30,6	44 von 60	78,6
Schaf	29	15	51,7	11 von 14	78,6
Ziege	3	3	100,0	1 von 2	50,0
Gesamt	215	74	34,4	56 von 72	77,8

Von allen 215 untersuchten Hauswiederkäuern wiesen 74 Tiere (34,4 %) eine Hirnstammzerephalitis vom Listeriose-typ auf. Bei fast ebensovielen Tieren (31,0 %) konnte der Erreger der Listeriose, *L. monocytogenes*, nachgewiesen werden. Allerdings waren von diesen 10 Rinder (4,7 %) ohne mikroskopisch nachweisbare Veränderungen im Gehirn (Tabelle 16). Daneben wurde auch die als apathogen geltende Art *L. innocua* isoliert, und zwar bei den 74 histologisch positiven Tieren 3mal (4,0 %) und bei 19 histologisch negativen aber bakteriologisch positiven Tieren insgesamt 10mal (52,6 %). In allen 19 Fällen ohne histologische Veränderungen ließen sich somit aus 15 Rindergehirnen 9mal *L. m.* und 6mal *L. innocua* anzüchten. Ein Rindergehirn enthielt beide Listerienarten gleichzeitig. Bei den Listerien-Isolaten der 3 histologisch negativen Schafgehirne handelte es sich jedesmal um *L. innocua*.

Tabelle 16 Falschpositive Fälle bei der bakteriologischen Untersuchung

Tierart	n	Hist.-/Bakt.+	nv %	L. m.	%	L. innocua	%
		nv					
Rind	183	16 *	8,7	10	62,5	7	43,8
Schaf	29	3	10,3	-		3	100,0
Ziege	3	-	-	-	-	-	-
Gesamt	215	19 *	8,8	10	52,6	10	52,6

n = Gesamtzahl untersuchter Fälle

nv = absolute Häufigkeit histologisch negativer und bakteriologisch positiver Fälle

nv % = relative Häufigkeit histologisch negativer und bakteriologisch positiver Fälle bezogen auf n

% = relative Häufigkeit bezogen auf nv

* = in einem Fall L. m. und L. innocua gleichzeitig isoliert

Tabelle 17 Anteil der prozentualen Übereinstimmung zwischen Histologie und Bakteriologie

	Histologie					
	Rind		kleine Wiederkäuer		Gesamt	
	+	-	+	-	+	-
Bakteriologie +	44	10	12	-	56	10
Bakteriologie -	11	118	3	13	14	131

* (L. monocytogenes wurde als bakteriologisch positiv, L. innocua als negativ gewertet)

Der Anteil der prozentualen Übereinstimmung beträgt demnach beim Rind 88,5 %, bei den kleinen Wiederkäuern 89,3 % und insgesamt 87,8 %. Das bedeutet, daß beide Verfahren in etwa 88 - 89 % zum gleichen Ergebnis kommen. In ca. 11 % der Fälle unterscheiden sich die Ergebnisse von Histologie und Bakteriologie.

3.2.4 Immunhistologie

3.2.4.1 Listeria-Reinkulturausstriche

a) Indirekte Immunofluoreszenz (IF):

Die *L. monocytogenes*-Stämme 4 b und 1/2 a zeigten in den Ausstrichpräparaten deutliche, spezifische Fluoreszenz. Die Art der Fixierung (Hitze, Azeton, Alkohol) spielte dabei keine Rolle. Die Hintergrundfluoreszenz sowie unspezifische Reaktionen waren meistens nur gering, so daß die Keime kontrastreich aus der Umgebung gelbgrün hervorleuchteten. Listerienkulturen, die mit verdünntem negativem Kaninchen-serum inkubiert worden waren, wiesen keine Fluoreszenz auf.

Beim Betrachten der Präparate bei 63facher oder 100facher Vergrößerung verblaßte das eingestellte Gesichtsfeld innerhalb weniger Minuten. Bereits nach 15 Minuten waren die Keime kaum noch zu erkennen.

b) PAP-Färbung:

Durch die hierbei verwendete AEC-Substratlösung färbten sich die Listerien braunrot an. Die Fixierungsmethode war ebenfalls ohne Einfluß auf die Anfärbbarkeit. Je dichter die Bakterien beieinanderlagen, umso geringer war die Farbintensität. Am Rande der Ausstriche färbten sich die Keime meist stärker an

als im Zentrum. Die Listerien erschienen als polymorphe, an den Enden abgerundete Stäbchen. Der Hintergrund färbte sich nur gering an. Unspezifische Reaktionen in Form von Substratablagerungen oder kleinen, punktförmigen Partikeln traten stärker in Erscheinung als bei der Immunofluoreszenz.

In Kontrollpräparaten mit negativem Kaninchenserum waren die Listerien nur als blaßgraue Stäbchen zu erkennen.

3.2.4.2 Abklatschpräparate

a) Indirekte IF:

Abklatschpräparate vom Bereich der Pons von histologisch positiven und negativen sowie bakteriologisch positiven und negativen Rindergehirnen zeigten insgesamt sehr starke unspezifische Fluoreszenz. Hitze-fixierung brachte gegenüber der Azetonfixierung keinen Vorteil. Sowohl in Kontrollpräparaten mit negativem Kaninchenserum als auch in Abklatschpräparaten mit Listeriaantiserum leuchteten zahlreiche Gewebepartikel in verschiedensten Größen und Formen, so daß eine Unterscheidung von Bakterien und anderen Strukturen unmöglich war. Zellen oder Zellformen waren nicht zu erkennen. Lediglich in Positivkontrollen, bei denen eine Listerienaufschwemmung auf das Abklatschmaterial aufgebracht wurde (3.1.3.8), konnten Listerien als leuchtende Stäbchen vom übrigen leuchtenden Material unterschieden werden, da sie in großer Zahl vorhanden waren.

b) PAP-Färbung:

Insgesamt wurden 34 Gehirne untersucht, die sich wie folgt verteilten:

Hist., Bakt.	Rind	Schaf
+	16	2
+	3	
-	2	
-	9	2

Bei der unter 3.1.3.2.2 angegebenen Färbetechnik wiesen die Präparate starke unspezifische Farb-reaktionen und mäßige Hintergrundfärbung auf. Diese Reaktionen bestanden aus AEC-Farbniederschlägen, die häufig als polymorphe, z. T. mehrere Bildebenen überschneidende Konglomerate verschiedenster Größen auftraten. In den meisten Präparaten konnten verschiedene andere Bakterien im ganzen Abklatschgewebe verstreut als blaßgraue bis hellgraue Stäbchen festgestellt werden. Nachdem das 1:10 bis 1:20 verdünnte NSS unverdünnt angewendet wurde, ging die Hintergrundfärbung fast völlig zurück. Auch die unspezifischen Reaktionen konnten dadurch in vielen Fällen reduziert werden. Dennoch blieben in Präparaten von veränderten und unveränderten Gehirnen gleichermaßen braune Substratpartikel bestehen, die teilweise stäbchenartige Struktur aufwiesen und nicht von spezifischem Listerienantigen unterschieden werden konnten. Auch bei Negativkontrollen traten dadurch Schwierigkeiten in der Beurteilung auf. Unter den 34 untersuchten Gehirnen konnte man in 6 Fällen (5 Rinder, 1 Schaf) eindeutige rotbraun gefärbte Stäbchen in der Größe von Listerien in den jeweiligen Abklatschpräparaten erkennen. Meist lagen sie in kleinen Kolonien beisammen. Einzelne freiliegende Stäbchen waren selten. In den Einzelpräparaten waren die Listerien immer nur an einer oder ganz wenigen Stellen zu finden, so daß jeweils das ganze Präparat sehr genau und aufmerksam durchgemustert werden mußte. Alle positiven Fälle stammten von histologisch als auch

bakteriologisch positiven Gehirnen. In den Negativkontrollen dieser Präparate konnten eindeutige Stäbchen nicht nachgewiesen werden. Allerdings traten mit stärkeren unspezifischen Reaktionen auch stäbchenförmige braune Partikel auf, wodurch eine klare Negativaussage häufig nicht mehr möglich war.

Abklatschpräparate von frischem Material erbrachten gegenüber denen von tiefgefrorenem Material keine Verbesserung der Resultate.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so ergeben sich für die Diagnose der zerebralen Listeriose durch immunhistologische Untersuchung von Abklatschpräparaten keine Verbesserungen. Bei Anwendung der indirekten IF ist eine Beurteilung der Präparate nicht möglich und die Interpretation der Ergebnisse bei der PAP-Färbung ist mit zu großen Schwierigkeiten behaftet.

3.2.4.3 Gefrierschnitte nach Formalin-Fixierung

Versuche, Listerien durch die Immunofluoreszenz- und PAP-Färbung in Gefrierschnitten nachzuweisen, verliefen in beiden Fällen negativ.

Die minimale Schnittdicke von formalinfixiertem Gewebe betrug bei dieser Schneidetechnik 6 µm. In den Schnitten lagen dadurch zwei oder mehrere Zellschichten übereinander, was zu starken unspezifischen Farbreaktionen führte. Diese fluoreszierenden bzw. braungefärbten Niederschläge und Hintergrundfärbungen konnten auch durch mehrmaliges und langdauerndes Waschen der Präparate zwischen den einzelnen Färbeschritten nicht beseitigt werden. Der Ersatz von verdünntem durch unverdünntes NSS in der PAP-Technik erbrachte ebenfalls keine wesentliche Ver-

besserung. Ob es sich bei kleinen stäbchenförmigen Strukturen um Listerienantigene oder um unspezifische Effekte handelte, konnte nicht entschieden werden, da sie in veränderten wie unveränderten Präparaten und sogar in Negativkontrollen festgestellt wurden. Häufig fehlte diesen listerienähnlichen Gebilden auch der Bezug zu entzündlichen Zellreaktionen. Nur in Positivkontrollen, bei denen eine Listerienaufschwemmung auf die Schnitte strichförmig aufgetragen wurde, waren die zahlreichen Keime eindeutig erkennbar.

4.2.4.4 Kryostatschnitte an frischem, unfixiertem Material

Die Schnittdicke der Präparate ist bei immunhistologischen Untersuchungen von großer Bedeutung (3.2.4.3). Mit dieser Schneidetechnik konnten von unfixiertem, tiefgefrorenem Gehirnmateriale dünnere Schnitte angefertigt werden (3 - 4 μm) als von formalinfixiertem Gewebe mit der Gefrierschneidetechnik. Die Haftung der Schnitte auf den Objektträgern war ohne Chromalaun-Gelatine-Beschichtung genauso gut wie mit, so daß auf eine Beschichtung verzichtet wurde.

a) Indirekte IF:

Insgesamt wurden 43 Tiere (34 Rinder, 7 Schafe und 2 Ziegen) untersucht. Als großer Nachteil dieser Methode wurde empfunden, daß unter dem Fluoreszenzmikroskop Lage und Art von Entzündungserscheinungen in den Schnitten nicht zu erkennen waren. Zellstrukturen waren nicht zu identifizieren. So mußten die Präparate jeweils systematisch über die gesamte Fläche abgesucht werden. Beim Betrachten mit stärkerer Vergrößerung bleichten fluoreszierende Strukturen relativ rasch aus.

In den meisten Fällen leuchtete der Hintergrund nur schwach, während unspezifische Reaktionen häufiger beobachtet wurden. Diese bestanden aus zahlreichen fluoreszierenden Punkten oder polymorphen Konglomeraten unterschiedlicher Größe. Durch eine Gegenfärbung mit Evans Blue (0,01 % Zugabe zum FITC-Konjugat) konnte zwar der Kontrast verbessert, die unspezifischen Reaktionen jedoch nicht beseitigt werden.

Als listeria-positiv wurden Präparate bewertet, bei denen mehrere helleuchtende stäbchenförmige Bakterien festgestellt werden konnten und bei denen gleichzeitig die negativen Kontrollpräparate keine solchen Keime aufwiesen.

Die Listerien lagen häufig in kleinen Kolonien zusammen. Eine Beziehung zu Entzündungserscheinungen konnte nicht hergestellt werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. Nur die Isolierung von L. m. wurde als bakteriologisch positiv bewertet.

Tabelle 18 Vergleich fluoreszenzserologischer Befunde von Kryostatschnitten mit histologischen und bakteriologischen Befunden

Hist./Bakt.	Immunofluoreszenz									Summe	
	positiv			negativ			Gesamt			positiv	
	Rd	Sf	Zg	Rd	Sf	Zg	Rd	Sf	Zg	+/-	%
+ / +	7	3	1	14	2	-	21	5	1	11/27	40,7
+ / -	2	-	-	4	1	1	6	1	1	2/8	25,0
- / +	-	-	-	4	-	-	4	-	-	-	-
- / -	-	-	-	3	1	-	3	1	-	-	-
Gesamt	9	3	1	25	4	1	34	7	2	13/43	30,2

Hist./Bakt. = Histopathologischer/Bakteriologischer Befund

+ = positiv

Rd = Rind

Zg = Ziege

- = negativ

Sf = Schaf

Von 35 histologisch positiven Tieren zeigten 13 Tiere (37,1 %) positive Reaktionen. Von den untersuchten Rindern mit Listeriose war ein Drittel positiv. 2 von 8-Tieren, bei denen der Erreger nicht nachgewiesen wurde, erwiesen sich in der Immunofluoreszenz als positiv. Wenn keine histologischen Veränderungen vorlagen, war auch der fluoreszenzserologische Nachweis negativ.

b. PAP-Färbung:

Nachdem erste Versuche, Listerienantigene in Kryostatschnitten nachzuweisen, mit der PAP-Färbung erfolgreich verlaufen waren, sollte der Wert dieser Methode für eine rasche Labordiagnostik aufgrund des gesammelten Materials untersucht werden.

Anfangs enthielten die Präparate zahlreiche nicht-spezifische Farbreaktionen sowie häufig auch Bakterienverunreinigungen. Die Bakterien erschienen als blaßgraue, z. T. schwach braun angefärbte Stäbchen und waren im gesamten Präparat, unregelmäßig verteilt, zu finden.

Um diese Erscheinungen so weit wie möglich auszuschalten, wurden die Einflüsse verschiedener Parameter untersucht:

1. Schnittdicke:

Von einem histopathologisch veränderten Rindergehirn wurden im Bereich der vorderen Medulla oblongata kurz hinter der Pons Kryostatschnitte von 2, 4, 6, 8 und 10 μ m Dicke angefertigt und mit der PAP-Methode gefärbt.

Die besten Ergebnisse erbrachten 4 μ m dicke Schnitte. Hier waren Hintergrundfärbung und unspezi-

fische Reaktionen relativ gering, die Veränderungen waren gut zu bewerten. Bei 6 μm zeigten sich stärkere Störreaktionen, die Beurteilung der Schnitte bereitete dieselben Schwierigkeiten wie bei Gefrierschnitten (3.2.4.3). 8 und 10 μm dicke Präparate waren nicht mehr zu beurteilen, da Substratniederschläge sich nicht mehr vollständig aus dem Gewebe entfernen ließen. 2 μm dicke Präparate zeigten zwar nur geringe unspezifische Erscheinungen, doch waren sie schwierig zu schneiden und sehr empfindlich.

2. Reinigung der Objektträger:

Eine vorherige Reinigung nach der unter 3.1.5 angegebenen Methode blieb ohne Einfluß auf Färbequalität oder störende Reaktionen.

3. Fixierung:

Eine alleinige Fixierung durch das Methanol/ H_2O_2 -Bad war ausreichend. Im Vergleich zu vorheriger Azetonfixierung wurden keine Qualitätsunterschiede beobachtet. Die Präparate sollten im Methanol/ H_2O_2 -Bad ab und zu bewegt werden, da sonst die endogene Peroxidase ungenügend inaktiviert wird. Bei Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration über 0,5 % nahmen die unspezifischen Reaktionen zu.

4. Zusatz von Schweineserum:

Durch Zusatz von jeweils 10 % normalem Schweineserum (NSS) zum Antiserum, Sekundären Antikörper und PAP-Komplex sowie durch vorherige Inkubation der Schnitte mit unverdünntem NSS konnten unerwünschte Nebenerscheinungen ebenfalls reduziert werden.

5. Sterilfiltrieren von Reagenzien:

Um störende Begleitkeime auszuschalten, wurden Methanol/ H_2O_2 -Bad, NSS, Primärer und Sekundärer Antikörper, PAP-Komplex und AEC-Substrat sterilfiltriert (Millipore 0,6 μm). Ohne nennenswerten Einfluß blieb das Sterilfiltrieren von Methanol/ H_2O_2 -Bad, Sekundärem AK und PAP-Komplex, während es sich

bei NSS, Primärem Antiserum und Substrat günstig auswirkte.

6. Waschzeiten:

Unter Konstanthalten der jeweiligen Färbezeiten von 30 min. wurden zwischen den einzelnen Inkubationsschritten verschiedene Präparate jeweils immer 2 x 5 min., 2 x 10 min. oder 3 x 10 min. in TBS gewaschen. Dabei zeigte sich, daß ein gründliches Spülen der Präparate nach dem Methanol/H₂O₂-Bad von großem Einfluß auf die Färbequalität ist. Die besten Ergebnisse erzielte dabei ein 5minütiges Spülen in Aqua dest. und anschließendes 3 x 10minütiges Waschen in TBS. Zwischen den übrigen Schritten genügte ein zweimaliges Waschen von je 10 Minuten.

7. Substratkonzentration:

Die von BOURNE (1983) angegebene AEC-Substratkonzentration von 4 mg in 14 ml Azetatpuffer wurde auf die Hälfte reduziert.

Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Dadurch ließen sich unerwünschte Reaktionen ebenfalls vermindern.

8. Natives Material lieferte weniger unspezifische Reaktionen und Verunreinigungen als längere Zeit tiefgefrorenes Material.

Unter Einbeziehung dieser Resultate konnten durch Modifizierung der bei 3.1.3.2.2 angegebenen Färbetechnik bei Kryostatschnitten die Hintergrundfärbung vollständig und die unspezifischen Reaktionen einschließlich der Begleitkeime zum größten Teil ausgeschaltet werden.

Demnach wird für die Kryostatschnitte folgende PAP-Färbetechnik vorgeschlagen:

- a) Aufziehen von max. 5 µm dicken Schnitten auf unbeschichtete Objektträger, Lufttrocknen bei Raumtemperatur 1 h.
- b) Inaktivierung der endogenen Peroxidase in Methanol/0,5 % H₂O₂-Bad für 20 min., ab und zu bewegen.
- c) Aqua dest. 5 min., in TBS kurz eintauchen, danach in dreimal gewechseltem TBS (jeweils frisch) jeweils 10 min. Spülen.
- d) Sterilfiltriertes NSS (Millipore 0,6 µm), 30 min. in feuchter Kammer inkubieren.
- e. Abkippen des NSS, überschüssige Flüssigkeit absaugen, Auftragen des sterilfiltrierten Listeria monocytogenes-Antiserums, 1:1000 in TBS verdünnt, mit Zusatz von 10 % NSS, Inkubation 30 min. bei Raumtemperatur in feuchter Kammer.
- f) Abkippen des primären Antiserums, überschüssige Flüssigkeit absaugen, Spülen der Schnitte in zweimal gewechseltem TBS jeweils 10 min.
- g) Schweine-Anti-Kaninchen-Ig in einer TBS-Verdünnung von 1:50 mit Zusatz von 10 % NSS, Inkubation 30 min. bei Raumtemperatur in feuchter Kammer.
- h) Abkippen, Absaugen und Spülen wie unter f).
- i) PAP-Komplex vom Kaninchen in einer TBS-Verdünnung von 1:50 mit 10 % NSS, Inkubation 30 min. bei Raumtemperatur in feuchter Kammer.

- k) Abkippen, Absaugen und Spülen wie unter f).
- l) 2 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) in 1 ml N.N-Dimethylformamide lösen, 14 ml 0,1 M Azetatpuffer pH 5,2 zugeben und sterilfiltrieren, 0,15 ml 0,3 % H₂O₂ zugeben und 15 min. inkubieren.
- m) Abkippen, Spülen in Aqua dest. für 2 min., kurz eintauchen in TBS, dann zweimal gewechseltes TBS für je 10 min.
- n) Gegenfärbung in Hämalun für 2 min. Anschließend Bläuen der Schnitte durch 10maliges Eintauchen in Ammoniakwasser.
- o) Einbetten in Glyceringelatine.

Art und Lokalisation des spezifischen Listerienantigens:

Das spezifische Reaktionsprodukt mit Listerien bestand aus unterschiedlich geformten Stäbchen oder granulärartigen, z. T. auch diffusen zytoplasmatischen Farbreaktionen (Abb. 5 - 7). Das Listeriaantigen war vorwiegend intrazellulär, gelegentlich auch extrazellulär lokalisiert. Am häufigsten wurde es in parenchymalen, und nur selten in perivaskulären Infiltraten angetroffen. Als positiv wurden nur stäbchenförmige extra- und intrazelluläre, deutlich braune Niederschläge in oder in näherer Umgebung von entzündlichen Reaktionen gewertet. Waren die entzündlichen Veränderungen im Schnitt nur dezent, so konnten auch meistens keine Listerien gefunden werden. Nur in 3 Fällen mit geringgradigen Entzündungserscheinungen gelang ein eindeutiger Nachweis. Durch Vergleich negativer Kontrollpräparate mit den zu beurteilenden Präparaten konnten unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden.

Von 80 durch Kryostatschnitte untersuchten Gehirnen konnten 73 Fälle (56 Rinder, 15 Schafe, 2 Ziegen) beurteilt werden. Bei 5 Tieren (4 Rinder, 1 Schaf) wiesen die eingefrorenen Hirnteile keine histologischen Veränderungen auf. 2 Rinder und 1 Ziege lieferten ein fragliches Ergebnis. Tabelle 19 gibt die Ergebnisse der 73 Fälle wieder.

Tabelle 19 Immunhistologischer *Listeria monocytogenes*-Antigennachweis in Kryostatschnitten durch PAP-Färbung im Vergleich mit histologischen und bakteriologischen Befunden

Hist./Bakt.	PAP-Färbung						Gesamt		
	positiv			negativ					
	Rind	Schaf	Ziege	Rind	Schaf	Ziege	Rind	Schaf	Ziege
+ / +	24	6	1	12	4	-	36	10	1
+ / -	2	-	-	6	2	1	8	2	1
- / +	-	-	-	7	-	-	7	-	-
- / -	-	-	-	5	3	-	5	3	-
Gesamt	26	6	1	30	9	1	56	15	2

Bei 58 histologisch positiven Tieren konnte in Kryostatschnitten 33mal (56,9 %) *Listerien*antigen nachgewiesen werden. Bei Rindern lag der Prozentsatz sogar bei 61,9 %. Betrachtet man nur die histologisch und bakteriologisch positiven Tiere, so erwiesen sich zwei Drittel der Tiere in der PAP-Färbung als positiv. Bei 11 Tieren, bei denen der bakteriologische Erregernachweis nicht gelang, konnten in 2 Fällen *Listerien* mittels Immunhistologie nachgewiesen werden. In Schnitten ohne histopathologische Veränderungen fanden sich auch keine positiven immunhistologischen Reaktionen. Die zugehörigen Negativkontrollen waren jeweils immer negativ. Geringgradige

unspezifisch diffuse oder granuläre Anfärbungen wurden mitunter beobachtet; sie waren morphologisch mit Listerienantigenen in positiven Präparaten nicht identisch.

5.2.4.5 Paraffinschnitte

Die besten immunhistologischen Ergebnisse waren mit Paraffinschnitten zu erzielen. In einer Arbeit von DE VARGAS PEIXOTO (1986) sind diese immunhistologischen Untersuchungen an Formalinmaterial mit der PAP-Technik ausführlich abgehandelt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine umfassende Bearbeitung des gesammelten Materials verzichtet und nur von einigen wenigen Fällen Paraffinschnitte angefertigt. Das Institut für Tierpathologie der Universität München, Abteilung Neuropathologie, stellte zusätzlich etwa ein Dutzend Paraffinschnitte histologisch listeriosepositiver Rinder freundlicherweise zur Verfügung.

a) PAP-Färbung:

Die Reaktionsprodukte stellten sich im wesentlichen wie bei Kryostatschnitten dar. Hintergrundfärbungen traten keine und unspezifische Reaktionen nur in geringem Maße auf. Listerien waren insgesamt klarer und eindeutiger zu erkennen. Die von DE VARGAS PEIXOTO (1986) beschriebene Brauchbarkeit der Methode für den Listeriosenachweis an routinemäßig hergestellten formalinfixierten Paraffinschnitten konnte bestätigt werden.

b) ABC-Färbung:

Mit dieser Methode konnte eine weitere qualitative Verbesserung erzielt werden, da hierbei so gut wie keine störenden unspezifischen Erscheinungen und Hintergrundreaktionen auftraten. Einzelne Bakterien oder kleine Kolonien traten intra- und extrazellulär in Erscheinung (Abb. 8 u. 9).

3.2.5 Vergleich zwischen Histologie, Bakteriologie und Immunhistologie

Histopathologische, bakteriologische und immunhistologische (PAP-Färbung an Kryostatschnitten) Resultate werden in Tabelle 20 verglichen. Es sind nur die Fälle aufgelistet, die in mindestens einer der drei Methoden ein positives Ergebnis zeigten. Drei immunhistologisch fragliche Fälle wurden hierbei als negativ gewertet.

Tabelle 20 Vergleich histologischer, bakteriologischer und immunhistologischer Ergebnisse

Hist./Bakt./PAP			Rind n = 52	Schaf n = 12	Ziege n = 2	Gesamt n = 66	%
+	+	+	24	6	-	30	45,5
+	+	-	14	4	1	19	28,8
+	-	-	6	2	1	9	13,6
-	-	+	-	-	-	-	
-	+	+	-	-	-	-	
-	+	-	6	-	-	6	9,1
+	-	+	2	-	-	2	3,0
Hist. +			46	12	2	60	90,9
Bakt. +			44	10	1	55	83,3
PAP +			26	6	-	32	48,5
Erregernachweis mit							
Hist*/PAP			n = 30	n = 9		n = 39	%
+	+		8	5	-	13	33,3
+	-		8	3	-	11	28,2
-	+		14	1	-	15	38,5

* = Nisslfärbung

45,5 % waren in allen drei Methoden positiv, 22,9 % nur in einer Untersuchungstechnik. Die PAP-Färbung zeigte nur dann ein positives Resultat, wenn gleichzeitig histologische Entzündungserscheinungen vorhanden waren. Die kulturelle Erregerisolierung bei 55 Tieren fand nur bei 30 Tieren (54,5 %) eine immunhistologische Bestätigung durch die PAP-Färbung.

Stäbchenförmige Keime konnten bei einem Drittel der Präparate mit der Nissl-Färbung und mit PAP-Färbung festgestellt werden, die anderen zwei Drittel waren nur in einer der beiden Färbungen positiv.

Anamnese

Von 62 Tieren (47 Rinder, 12 Schafe, 3 Ziegen) konnten genaue Angaben erfaßt werden. Davon waren 46 Tiere (36 Rinder, 8 Schafe, 2 Ziegen) weiblichen und 16 Tiere (11 Rinder, 4 Schafe, 1 Ziege) männlichen Geschlechts. Die Altersverteilung ist aus Tabelle 21 ersichtlich. Während sich die Erkrankungen bei Schafen gleichmäßig auf alle Altersstufen verteilten, konnte bei Rindern eine Häufung bei Jungtieren (6 - 24 Mo.) und über 4 Jahre alten Tieren festgestellt werden. Das mittlere Lebensalter betrug 3,8 Jahre bei Rindern und 2 Jahre bei Schafen.

Tabelle 21 Altersverteilung listeriosepositiver Hauswiederkäuer

Alter	Rind	Schaf	Ziege	Gesamt
2 - 6 Mo.	1	3	-	4
6 - 24 Mo.	20	4	1	25
2 - 4 J.	7	3	2	12
4 - 8 J.	19	2	-	21
Total	47	12	3	62
Mittl. Alter Jahre	3,8	2,0	2,7	

Die 47 Rinder gehörten folgenden Rassen an:
Deutsches Fleckvieh (23), Braunvieh (15), Schwarz-
bunte (7) und Rotbunte (2).

Von 46 weiblichen Tieren waren 25 (54,3 %) trächtig.
Von 10 kleinen Wiederkäuern waren nur 1 Schaf und
1 Ziege trächtig, jeweils im letzten Drittel der
Gravidität. Bei Rindern ergab sich folgende Verteilung:

Tabelle 22 Trächtigkeitsrate weiblicher Rinder mit Gehirn-
listeriose

Trächtigkeitszeit	n	%
1 - 3 Mo.	7	50,0
3 - 6 Mo.	13	56,6
6 - 9 Mo.	5	50,0
Trächtig	25	54,3
nicht trächtig	13	56,1
Gesamt	38	100

Die von den Besitzern am häufigsten beobachteten
Befunde bei Hauswiederkäuern waren gestörte Futter-
und Wasseraufnahme, Speichelfluß, Gleichgewichts-
störungen, Kopfschiefhaltung und Gesichtslähmungen.
Über 50 % der Tiere kamen im Verlaufe der Erkrankung
zum Festliegen. Von 32 Tieren wiesen 9 (28,1 %) eine
erhöhte Körpertemperatur auf (Tabelle 23).

Tabelle 23 Häufigkeit anamnestisch beschriebener Symptome

Klinische Symptome	Rind n = 47	Schaf n = 12	Ziege n = 3	Total n = 62	%
nicht gemessen	20	7	3	30	48,4
Temperatur $\leq 39,0^{\circ}$ C	19	4	-	23	37,1
Temperatur $> 39,0^{\circ}$ C	8	1	-	9	14,5
Gestörte Wasseraufnahme	29	9	2	40	64,5
Gestörte Futteraufnahme	44	11	2	57	91,9
Schluckbeschwerden	18	1	-	19	30,6
Salivation	25	5	2	32	51,6
Apathie	14	5	-	19	30,6
Schreckhaftigkeit	4	-	-	4	6,5
Anlehnen an Gegenstände	8	-	1	9	14,5
Kreisbewegungen	4	7	2	13	21,0
Vorwärtsdrang	14	-	-	14	22,6
Kopfschiefhaltung	28	7	1	36	58,1
Gleichgewichtsstörungen	36	7	2	45	72,6
Niederstürzen	11	1	-	12	19,4
Festliegen	22	8	2	32	51,6
Ruderbewegungen	6	3	-	9	14,5
Fazialislähmung (Ptosis v. Ohr, Oberlid, Oberlippe)	19	5	-	24	38,7
Sonstige:					
Absonderung	5	4	-	9	14,5
Konjunktivitis	5		-	6	9,7
Krämpfe, Steifheit	5	1	-	6	9,7
Indigestion	4		-	4	6,5
Unruhe	4		-	4	6,5

Die Krankheitsdauer der erkrankten Wiederkäuer variierte von einem, bis zu 14 Tagen (Tabelle 24). Schafe waren insgesamt länger krank oder wurden später getötet als Rinder. Die meisten Tiere wurden (meist nach 2 - 3 Tagen) der Schlachtung zugeführt. Drei der verendeten Rinder starben 2 Tage, eines vier Tage nach Auftreten der ersten Symptome. 2 Schafe verendeten nach 2 Tagen, 2 nach 10 Tagen und weitere 2 nach 14 Tagen.

Tabelle 24 Krankheitsdauer an Listerienenzephalitis erkrankter Hauswiederkäuer

KH-Dauer (in Tagen)	Rind	Schaf	Ziege
1	5	1	-
2 - 3	26	4	3
4 - 5	10	2	-
6 - 10	5	3	-
11 - 14	1	2	-
Mittelwert (Tg.)	3,4	6,3	2,7
geschlachtet/ getötet	43	6	3
verendet	4	6	-

Bei Rindern erkrankten nur in einem Betrieb zwei Tiere gleichzeitig. In den übrigen Betrieben handelte es sich um Einzelfälle. Bei Schafen hatten 3 von 10 Betrieben mehrere Listeriosefälle gleichzeitig.

In Tabelle 25 sind die Zusammenhänge mit Silagefütterung bei Rindern und die Ergebnisse der Silageprüfung zusammengestellt. Die Beurteilung der Silagequalität erfolgte nach dem Bewertungsschlüssel der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG). Anhand grobsinnlicher Prüfung von Geruch, Gefüge und Farbe wurde das Silierfutter in 4 Güteklassen eingeteilt (Merkblatt 224: Bewertung von Grünfutter, Silage und Heu; DLG, Frankfurt).

In einigen Fällen konnten keine Silageproben entnommen werden, weil das Siliergut bereits vollständig verfüttert worden war. 43 von 47 Rindern (91,5 %) waren mit Maissilage gefüttert worden, 28 mit Grassilage (59,6 %). 13 Tiere davon erhielten nur Maissilage, 2 Tiere nur Grassilage. In je einem Fall wurde zusätzlich Ganzpflanzensilage, Rapssilage oder Rübenblattsilage verabreicht. 3 Rinder hatten 2 Wochen oder länger vor Erkrankungsbeginn nur Grünfutter erhalten. In einem der drei Betriebe wurde über eine meist stärkere Verschmutzung des Grünfutters mit Erde berichtet, da es zu dieser Zeit häufig regnete. Das zweite Tier hatte des öfteren Klee erhalten, der zum Teil Fäulnisercheinungen aufwies. Das dritte Rind war seit einigen Monaten ständig auf der Weide gewesen.

Bei den kleinen Wiederkäuern waren 3 Tiere mit Mais- und Grassilage, je 2 Tiere nur mit Mais- oder nur mit Grassilage gefüttert worden. 5 Schafe und 1 Ziege bekamen keinerlei Silierfutter. Interessanterweise konnte bei einem dieser 5 Schafe nach dem Auftreten der ersten Symptome ein loser Zahn festgestellt werden.

Erdfachsilos, die nach Feststellungen KRÜGERS (1963) bezüglich der Silagequalität am ungünstigsten sind, wurden in 11 Betrieben verwendet. Beton-Fahrsilos,

die in 24 Betrieben eingesetzt wurden, bieten für eine luftdichte Abdeckung und vollständige Durchsäuerung des Futtermaterials die besten Voraussetzungen (WACHENDÜRFER und ZIRPEL, 1976; DIJKSTRA, 1987). Beton-Hochsilos wurden in 17 und Holz-Hochsilos in 11 Betrieben benutzt. 2 Hochsilos waren nur ca. 3 m hoch, so daß der Eigendruck des Siliermaterials für eine luftdichte Packung nicht ausreichend war. In einem Fall wurde Gras zu Rundballen gepreßt und mit Plastiksäcken, die im Jahr zuvor schon benutzt worden waren, verschlossen. Die Plastiksäcke waren weder gereinigt noch desinfiziert worden und wiesen meist mehrere Löcher auf, so daß ein größerer Teil der Silage verschimmelt war.

Die Silagen wiesen im Kern durchweg sehr gute bis befriedigende Qualität auf, während Randpartien häufig verdorben oder nur von mäßiger Qualität waren. Die kritische Schwelle von pH 4,8 wurde in Kernsilagen in 18,4 % der Proben überschritten, in Randsilagen dagegen bei 82,4 %. In 37 Betrieben (78,7 %) war im Silofutter Schimmelbildung aufgetreten und teilweise auch verfüttert worden. Handelsübliche säurehaltige Silierungszusätze wurden nur in 12 Betrieben (25,5 %) verwendet, eine Desinfektion der Silos vor dem Befüllen erfolgte bei 14 Betrieben (29,8 %). Mitunter traten mehr oder weniger starke Nachgärungen in der Silage auf. Einige Betriebe öffneten die Silos nach einiger Zeit wieder und füllten frisches Siliermaterial nach. Besonders bei Erdsilos wurden die Abdeckungen öfters von Mäusen oder Ratten beschädigt.

tabe lle 25 Übersicht über Silagefütterung und -qualität in Betrieben mit listeriosepositiven Rindern

Nr.	Silierfutter	Aufbewahrung	Silagequalität		pH-Wert Kern	Band	Schimmel (Säuerungs- mitte)		Desinfektion	Besonderheiten
			Kern	Rand						
01	M/G	E, HH	2/1	-	6,5/-	-	+	-	-	Nachfüllen, Schadhager
04	M/G	E, F	1/-	2/-	3,5/-	5,0/-	+	+	-	
06	M/Z	E, F	2/2	-	3,5/4,0	-	+	-	-	
07	M/G	BH	1/1	-	3,7/4,5	-	-	+	-	verschimmelte Futterrüben
08	G	E, P, IIII	3	4	-	-	+	+	-	Schadhager, Gras-Rund- ballen in Plastiksäcken siliiert
11	M/G	BH	2/3	-	3,5/4,0	-	+	-	+	
12	M/G	F	1/2	3/4	4,0/4,5	5,9/6,2	+	-	+	2 Jahre alte Silage ver- füttert, Grassilage teil- weise verdorben
13	M	BH	2	-	4,0	-	-	-	-	
14	M	E	1	-	3,3	-	+	-	-	Schadhager
15	M/G	F	1/1	2	3,0/3,2	3,2	+	-	+	
17	M/G	F, BH, HH	1/2	3/-	3,7/5,1	6,0/-	-	-	-	Nachfüllen, Verfütterung gefrorener u. anschließend 3 Tage im Stall gelagerter M.
18	G	HH	-	-	-	-	+	+	-	
19	M/G	BH	1/2	-	3,5/4,5	-	+	-	-	geringe Silohöhe
21	M	BH	2	4	4,0	6,2	+	+	-	
23	M/G	E, F, HH	1/2	3/3	4,8/5,8	6,5/6,2	+	-	-	
24	M/G	F	2/1	4/2	3,9/3,0	4,5/4,5	+	+	-	Nachgärungen
25	M/G	E, BH	1/2	3/3	3,9/5,8	4,8/5,9	+	-	-	Nachfüllen
26	M/G	F	3/3	4/4	4,9/5,9	6,0/6,2	+	+	+	Nachgärungen
27	M/G	F	1/-	3/-	3,5/-	6,2/-	-	+	+	

Nr.	Silierfutler	Aufbewahrung	Silagequalität		pH-Wert		Schimmel	Säuerungs- mittel	Desinfektion	Besonderheiten
	Kern	Rand	Kern	Rand						
29	M/G	1/-	3/-	3/-	3,8/-	6,7/-	+	-	+	
30	M/G	2/-	3/-	3/-	4,4/-	5,6/-	+	-	+	
31	M	2	4	4	5,0	7,6	+	-	-	hoher Befall mit Mais- beulenbrand
32	M	2	3	3	5,9	5,8	+	-	-	geringe Silohöhe
33	M/G	-	-	-	-	-	+	-	-	
34	M/G	1/2	4,3	4,3	4,5/5,2	6,7/5,6	+	-	-	
36	M/G/GPS	1 (GPS)	1	1	4,0	5,5	+	-	-	Schadhager Nachfüllen
37	M/G	1,2	3,3	3,3	3,0/4,2	6,4/4,5	+	+	-	
39	M/R	1/1	3/2	3/2	3,6/4,0	5,4/5,4	+	-	+	
41	M	1	2	2	4,8	5,9	-	+	-	Nachfüllen, Nachgärungen
42/45	M/G	-	-	-	-	-	+	-	-	Nachfüllen
46	M/G	-	-	-	-	-	+	-	+	
47	M/G	1 -	2 -	2 -	3,5	4,8	+	-	+	
48	M	1	-	-	3,8	-	+	+	-	
50	M/G	-	-	-	-	-	+	-	-	seit 2 Wo. nur Grünfütter, das durch lange Regen- perioden häufig verschmutzt war
51	M/G	3/3	-	-	-	-	+	-	+	Nachgärungen, Maisbeulen- brand, Restfutter vom Milchvieh verfüttert
52	M/G	1 -	-	-	4,8/-	-	+	-	-	Restfutter vom Milchvieh, Nachfüllen
53	M	1	2	2	4,8	5,6	+	-	-	
54	M/G	1/-	3/-	3/-	4,4/-	6,0/-	+	+	+	Futter häufig mit Erde verschmutzt

Nr.	Silierfutter	Aufbewahrung	Silagequalität		pH-Wert		Schimmel		Säuerungs- mittel	Desinfektion	Besonderheiten
			Kern	Rand	Kern	Rand					
55	M	F	1	3	4,2	5,4	+		-	+	
59	M	BH	2	3	4,9	6,2	+		-	+	
61	M	BH	2	3	3,9	5,8	+		-	-	Nachfüllen, Nachgärungen
62	M	HH	-	-	-	-	-		-	-	
65	-	-	-	-	-	-	-		-	-	nur Grünfütter, teilweise ungefütter klein
67	-	-	-	-	-	-	-		-	-	nur Weidehaltung
68	M	F	-	-	-	-	+		-	-	Restfütter vom Milchvieh,
69	M	F	1	3	3,5	5,4	-		-	-	Nachgärungen

Abkürzungen:

M = Maissilage

G = Grassilage

GPS = Ganzpflanzensilage

R = Rapssilage

Z = Zuckerrübenblattsilage

E = Erdflachsilo

F = Fahrsilo (Beton)

BH = Beton-Hochsilo

HH = Holz-Hochsilo

P = Plastiksäcke

Güteklassen:

1 = sehr gut - gut

2 = befriedigend

3 = mäßig

4 = verdorben

+ = ja

- = nein

4. Diskussion

4.1 Histopathologische Befunde

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die von zahlreichen Autoren beschriebenen histologischen Befunde bei spontaner Listerienenzephalitis der Hauswiederkäuer (URBANECK und LIPPMANN, 1961; TRAUTWEIN und BEHRENS, 1962; WUILLERET et al., 1969; CHARLTON und GARCIA, 1977; DE VARGAS PEIXOTO, 1986). Die Listerienenzephalitis beschränkte sich größtenteils auf den Hirnstamm, nur bei starken Entzündungserscheinungen im Rauten- und Mittelhirn dehnten sich die Veränderungen auf das Zwischenhirn bzw. Großhirn aus. Die Befunde lassen ebenfalls einen aus zahlreichen Untersuchungen bekannten Erregereintritt über die Gehirnnerven, insbesondere den N. trigeminus und den N. hypoglossus, vermuten (Kapitel 2.10), da in den Terminalgebieten dieser afferenten Nerven die Veränderungen am häufigsten und stärksten zu finden waren. Von Rautenhirn und Pons über Mittelhirn zum Zwischenhirn bzw. Großhirn zeigte die Stärke der Entzündungserscheinungen eine abnehmende Tendenz, wobei die zuletzt genannten Bereiche, wenn überhaupt, dann nur dezente Veränderungen aufwiesen.

Die entzündlichen Infiltrate bestanden meist aus neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, wobei rein granulozytäre Ansammlungen fast nur in parenchymalen Läsionen vorkamen. In perivaskulären Veränderungen dominierten Monozyten und Lymphozyten. Das Auftreten zahlreicher eosinophiler Granulozyten bei einem Rindergehirn läßt auf eine allergische Begleitreaktion schließen.

Obwohl 9 Fälle durch die routinehistologische Untersuchung des Gehirns nicht erfaßt wurden, da die Veränderungen nicht an den untersuchten Schnittstellen lokalisiert waren oder die Veränderungen nur sehr geringgradig waren, erbrachte die feingewebliche (neurohistologische) Untersuchung eine relativ hohe diagnostische Sicherheit.

Wenn man histologisch festgestellte listeriosepositive Gehirne im Bereich der Brücke oder kurz dahinter untersucht, so ist dort in 98,5 % der Fälle mit Veränderungen zu rechnen. Im Mittelhirn werden hingegen nur noch ca. 84 % erfaßt (Tab. 6).

Bei 42,9 % der Rinder und 73,3 % der Schafe konnten in den mit Cresylviolett gefärbten Präparaten zusätzlich stäbchenförmige Erreger nachgewiesen werden (Tab. 9). Da in diesen Präparaten der immunhistologische Antigen-nachweis (PAP-Technik, Kryostatschnitte) nur in 64,5 % gelang (Kap. 3.2.1.3), muß die mikroskopische Darstellung mit der Nissl-Färbung kritisch bewertet werden. Denn die Identität dieser Keime mit Listerien ist nicht gesichert. Aussagekräftiger sind dagegen immunhistologische Techniken. Zwar können hierbei Kreuzreaktionen auftreten, die verwendeten Antiseren zeigten solche aber nur bei grampositiven Kokken (Kap. 3.1.3.1.4).

4.2 Bakteriologische Befunde

Bei etwa 78 % der histologisch positiven Fälle konnte *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Wichtig für den Erfolg der Anzüchtung ist eine gründliche mechanische Zerkleinerung des Gewebesmaterials vor der Ausimpfung, da Listerien im Gewebe nicht gleichmäßig verteilt und häufig intrazellulär gelagert sind (SCHULTE und SCHOLZ, 1956; GRAY und KILLINGER, 1966). Wie bereits von anderen

Untersuchern beim Schaf festgestellt (JENTZSCH, 1960; URBANECK et al., 1963; MACLEOD und WELLS, 1986), ergibt die Direktkultur, auch beim Rind ähnliche oder nur geringgradig schlechtere Ergebnisse als die zeitaufwendige Kälteanreicherungsmethode. Listerien traten in den drei untersuchten Lokalisationsstellen unterschiedlich häufig auf (Tab. 14). Nur in 48,4 % fanden sie sich im Bereich des Großhirns bzw. Zwischenhirns. Bei alleiniger bakteriologischer Untersuchung des Hirnstammes ist mit einer gesamten Isolierungsrate von 74,2 % zu rechnen; wenn die Medulla oblongata noch miteinbezogen wird, werden 95,5 % der Erreger erfaßt.

Die Serotypverteilung isolierter Listerien entspricht dem von anderen Autoren (SEELIGER und EMMERLING, 1970; DIJKSTRA, 1987) festgestellten Muster. 13mal konnte der als apathogen angesehene Typ 6 (*L. innocua*) gefunden werden, davon wiesen 3 Tiere histologische Veränderungen auf. Der kulturelle Nachweis von *L. innocua* wurde bei der bakteriologischen Diagnose nicht berücksichtigt und *L. m.*-positive Fälle, die keinerlei Veränderungen im Gehirn aufwiesen, wurden nicht als Listeriose beurteilt. Es ist zwar bekannt, daß die Erreger latent im Organismus vorhanden sein können, ohne krankhafte Veränderungen hervorzurufen (DIJKSTRA, 1965; SIELAFF, 1966; BÜNING, 1975), ein Auftreten der zerebralen Listeriose ohne enzephalitische Erscheinungen ist aber kaum vorstellbar. Zudem stellen sich im Gehirn histologische Veränderungen sehr viel früher ein als die klinischen zentralnervösen Ausfallerscheinungen (BARLOW und MC GORUM, 1985). Höchstens in hochakuten Erkrankungsfällen mit Fieber können im Gehirn trotz positivem Erregernachweis die entzündlichen Infiltrate fehlen (WEIS, 1973). Die Isolierung von *L. m.* und *L. innocua* aus histologisch negativen Gehirnen wird aber eher auf eine sekundäre Kontamination der Gehirne zurückgeführt. In vielen Fällen waren die Gehirne bereits im Schlachthof unsteril entnommen und zusammen

mit den übrigen Proben für die bakteriologische Fleischuntersuchung in das STUA geschickt worden. Von der Entnahme bis zum kulturellen Anlegen der Gehirne bestehen zahlreiche Kontaminationsmöglichkeiten mit den ubiquitär verbreiteten Listerien.

Daß *L. innocua* bei allen bakteriologisch positiven und histologisch negativen Tieren sehr häufig (52,6 %), bei histologisch positiven aber nur selten (4,0 %) isoliert wurde (Tab. 16), spricht ebenfalls für eine Kontamination. Ebenso die Tatsache, daß *L. innocua* nie in der Direktkultur, sondern immer erst nach Anreicherung gewachsen ist. Diese Keime waren offensichtlich in sehr geringer Zahl im Probenmaterial vorhanden.

Das Anlegen des Gehirnmaterials erfolgte zwar unter sterilen Kautelen, jedoch ohne vorheriges Abflammen der Proben.

Eine spätere Kontamination während des kulturellen Verfahrens ist so gut wie ausgeschlossen, da ständig Negativkontrollen mitgeführt wurden. Allgemein jedoch muß die Kontaminationsrate der Gehirne relativ gering gewesen sein, da bei der Mehrzahl insgesamt negativer Fälle (87,7 %) keine Listerien isoliert werden konnten.

Stämme von *L. innocua* erwiesen sich im klassischen Mäuseversuch bisher immer als apathogen und waren auch nicht imstande, einen positiven Antonschen Konjunktivaltest zu provozieren (SEELIGER, 1981). Die Isolierung von *L. innocua* bei 6,1 % der untersuchten Gehirne von Rindern und Schafen mit zentralnervösen Störungen (Tab. 10) darf jedoch nicht ohne weiteres als belanglos angesehen werden. Es ist nicht auszuschließen, daß unter besonderen Verhältnissen doch eine Infektion mit *L. innocua* stattfand, zumal ein bestimmter Stamm dieses Genus nach intrazerebraler Inokulation bei Saugmäusen schon eine Enzephalitis hervorrufen konnte (PATOCKA et al., 1979). Die Eigenschaft

"Apathogenität" muß in diesem Zusammenhang kritisch bewertet werden, denn auch die Art *L. seeligeri*, die bisher ebenfalls als apathogen gegolten hatte, war, wie vor kurzem berichtet, Ursache einer eitrigen Meningitis beim Menschen (ROCCOURT et al., 1986).

Insgesamt gesehen stellt die beschriebene bakteriologische Untersuchungsmethode für die routinemäßige Listeriosediagnostik ein relativ sicheres und rasches Verfahren dar. Mittels Direktkultur kann ein Großteil der Fälle nach 2 Tagen beurteilt werden. Bei Anwendung eines Plattenmikroskops wäre es möglich, die Kulturen mit Henry'scher Beleuchtung auch schon nach 24 h abzulesen. Mit etwas Übung können auf diese Weise positive Kolonien mit hoher Sicherheit erkannt und negative ausgeschlossen werden. Die Beurteilung von Hämolysevermögen, Kolonieform, Katalasetest, Nativpräparat und Gramfärbung von verdächtigen subkultivierten Kolonien erlaubt innerhalb weiterer 24 h eine Unterscheidung pathogener und apathogener Listerien sowie eine grobe Abgrenzung von anderen Keimen. Auch fluoreszenzserologische Methoden sind in der Lage, die Isolate in angemessener Zeit weiter zu bestätigen (SMITH et al., 1960; EVELAND, 1963). SEELIGER (1962) rät von einer Objektträger-Agglutination mit polyvalenten Antiseren ab, da serologische Kreuzreaktionen leicht zu Fehldiagnosen führen können. Die Durchführung einer bis zu 8 Tage dauernden biochemischen Prüfung ist zeitraubend und für die Erfordernisse der bakteriologischen Routineuntersuchung zu langwierig. Soll aber die Diagnose nur durch den direkten kulturellen Erregernachweis gestellt werden, so muß die biochemische Differenzierung unbedingt erfolgen.

4.3 Immunhistologie

4.3.1 Abklatschpräparate

Obwohl die Immunfluoreszenztechnik bereits früher erfolgreich für den Listeriennachweis an Abklatschpräparaten eingesetzt wurde (Kap. 2.14), führte sie in eigenen Untersuchungen zu keinem für die Diagnostik brauchbaren Ergebnis. Die untersuchten Abklatschpräparate ließen weder eine Positiv- noch eine Negativbeurteilung zu.

Die PAP-Färbung zeigte zwar in einigen Fällen positive Resultate, doch waren die meisten Präparate aufgrund unspezifischer Reaktionen nicht eindeutig zu bewerten. Allein mit dieser Methode die Diagnose zu stellen wäre zu unsicher. Der Arbeitsaufwand steht in keinem Verhältnis zum Erfolg.

4.3.2 Gefrierschnitte nach Formalin-Fixierung

Da die Schneidetechnik eine Schnittdicke unter 6 µm nicht zuließ, konnten weder mit Immunofluoreszenz noch mit PAP-Technik positive Resultate erzielt werden. Dicke Schnitte verhindern nämlich ein vollständiges Eindringen der Antisera während der Färbung und verursachen falschnegative Reaktionen (NADJI und MORALES, 1983). Außerdem können die Reagenzien durch die Waschvorgänge nicht vollständig entfernt werden und führen zu starken unspezifischen Effekten.

4.3.3 Kryostatschnitte an frischem, unfixiertem Material

Die Immunhistologie erbrachte bei Kryostatschnitten bessere Resultate als bei Abklatschpräparaten und Gefrierschnitten.

37,1 % histologisch positiver Gehirne waren bei fluoreszenzserologischer Untersuchung positiv. Auch wenn die IF-Präparate eindeutiger beurteilt werden konnten als Abklatsch- und Gefrierschnittpräparate, so bieten positive Ergebnisse doch keine ausreichende Sicherheit, da vorhandene histopathologische Veränderungen in den Schnitten nicht nachweisbar sind und auch Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien auftreten können. Weitere Nachteile waren ein schnelles Verblassen der Fluoreszenzfärbung, das zeit-

raubende Aufsuchen positiver Reaktionen und das Auftreten unspezifischer Reaktionen. Die Anwendung der Immunofluoreszenz kann für eine Labordiagnostik in Untersuchungsämtern nicht empfohlen werden.

Nach Verbesserung der Färbetechnik (Kap. 3.2.4.4) wurden mit der PAP-Technik sämtliche gesammelten Fälle diesem Verfahren unterzogen. Listerienantigen konnte in vielen Präparaten histologisch positiver Tiere (61,9 % der Rinder und 56,9 % der Schafe) festgestellt werden. Durch wochenlange Tiefgefrierlagerung der Gewebeproben kam es offensichtlich zu keinem nennenswerten Antigenitätsverlust. Die wenigen im frischen Zustand geschchnittenen Präparate waren qualitativ etwas besser. Ob frisches Material auch quantitativ bessere Ergebnisse liefert, ließe sich nur an entsprechend größerer Zahl von frischem Untersuchungsmaterial überprüfen.

Die Art und Lokalisation spezifischer Listerienantigenreaktion entsprach weitgehend den von DE VARGAS PEIXOTO (1986) in Paraffinschnitten festgestellten Immunreaktionen.

Die von ihm als Zytoplasmaanfärbungen beschriebenen Reaktionen, die er als bakterielle Abbauprodukte mit erhaltener Antigenität interpretierte, konnten in Einzelfällen bei massiven histopathologischen Veränderungen ebenfalls festgestellt werden. Sie wurden jedoch nicht in die Beurteilung miteinbezogen, da eine Unterscheidung von unspezifischen Reaktionen nicht immer möglich war. Negativkontrollen mit normalem Kaninchenserum wiesen manchmal ähnliche Erscheinungen auf. Nur stäbchenförmige oder grobgranuläre Darstellung wurde deshalb als positiv beurteilt, da solche Strukturen in Negativkontrollen so gut wie nie zu finden waren.

Mit PAP-Technik gefärbte Kryostatschnitte können für die regelmäßige Anwendung in Untersuchungsämtern ebenfalls nicht empfohlen werden, da durch den täglichen

Umgang mit unfixiertem infektiösem Material das Laborpersonal unzumutbar gefährdet würde. Tollwutpositive Fälle können zwar relativ rasch abgeklärt werden, jedoch gibt es auch noch andere in tierischen Gehirnen vorkommende Erreger, die auf den Menschen übertragbar sind. Beim Schaf ist beispielsweise die Abgrenzung der Traberkrankheit (Scrapie) von der menschlichen JAKOB-CREUTZFELD-Krankheit keineswegs gesichert (DAHME und WEISS, 1988). Listerienhaltiges Material stellt zudem für schwangere oder abwehrgeschwächte Personen eine Gefahr dar.

..3.4 Paraffinschnitte

Das Zahlenmaterial untersuchter Präparate war in diesem Fall zwar gering, jedoch konnten die Feststellungen von DE VARGAS PEIXOTO (1986), daß Listerien erfolgreich durch die PAP-Technik in formalinfixierten Paraffinschnitten nachgewiesen werden können, insgesamt bestätigt werden. Bei ihm gelang der immunhistologische Nachweis von L. m.-Antigen bei 87 % der Rinder und Schafe mit Listerienenzephalitis.

Qualitativ waren Paraffinschnitte den Präparaten der anderen immunhistologischen Untersuchungstechniken überlegen. Das Anfertigen der Paraffinschnitte ist jedoch zeitaufwendiger als die übrigen Techniken für die Immunhistologie.

Der Listerienantigennachweis war auch mit Hilfe der Avidin-Biotin-Technik bei routinemäßig hergestellten formalinfixierten Paraffinschnitten von zerebralen Listerieninfektionen möglich. Die Qualität der Schnitte übertraf sogar noch die der PAP-Färbung, da keinerlei unspezifische Begleitreaktionen und Hintergrundfärbungen auftraten. Die hohe Spezifität dieser Methode ist auf

die starke Affinität des Glycoproteins Avidin gegenüber Vitamin H (= Biotin) zurückzuführen (BOURNE, 1983). Ein weiterer Vorteil ist, daß die verwendeten Reagenzien im Gegensatz zur PAP-Technik weit weniger toxisch sind.

4.3.5 Anamnese

Die registrierten anamnestischen und klinischen Befunde stimmen mit den Angaben in der Literatur weitgehend überein. Bei den dargestellten klinischen Symptomen konnten meist nur die von den Besitzern mehr oder weniger genau beobachteten Erscheinungen berücksichtigt werden. Diese entsprachen jedoch insgesamt dem in der Literatur beschriebenen Krankheitsbild (REBHUN und DELAHUNTA, 1982; STÜBER, 1985; DE VARGAS PEIXOTO, 1986). Die augenscheinlichsten Befunde für die Besitzer waren gestörte Futter- und Wasseraufnahme der Tiere. Daneben fielen Gleichgewichtsstörungen, Kopfschiefhaltung, Gesichtslähmungen und Speichelfluß am stärksten auf. Da die Mehrzahl der Tiere geschlachtet wurde, war eine genaue Ermittlung der Krankheitsdauer und somit ein Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, daß Schafe mehr akut und Rinder eher subakut erkranken (GRAY und KILLINGER, 1966; BIENFET et al., 1969), nicht möglich.

Silagebereitung, -aufbewahrung und -fütterung wiesen in den meisten Fällen erhebliche Mängel auf. Fast alle erkrankten Tiere hatten demzufolge teilweise minderwertiges oder gar verdorbenes Futter angeboten bekommen. Bei Rindern, die ausschließlich Grünfutter erhalten hatten, spielten Fütterungsfehler und witterungsbedingte Futterkontaminationen eine Rolle. Aufgrund der vieldeutigen Symptome ist es mit klinischen Mitteln allein nicht möglich, eine Listeriose mit hinreichender Sicher-

heit von ähnlichen Erkrankungen anderer Genese abzugrenzen (SEELIGER, 1962). Klinische und anamnestiche Befunde erlauben höchstens eine Verdachtsdiagnose.

Schlußfolgerungen

Berücksichtigt man die Erfordernisse einer möglichst schnellen, routinemäßig durchführbaren Labordiagnostik in tierärztlichen Untersuchungsstellen und strebt man eine Verbesserung der Diagnosesicherung an, so ergeben sich aus den Untersuchungen für die Diagnose der Listerienenzephalitis von Hauswiederkäuern, insbesondere für das Rind, folgende Konsequenzen:

1. Die histologische Untersuchung der Gehirne listerioseverdächtiger Tiere ist für die Diagnosestellung unerläßlich. Dabei muß das Stammhirn möglichst an mehreren Stellen und auf beiden Seiten untersucht werden. In jedem Fall sollte das Rautenhirn (wenn möglich im Bereich der Brücke) in die Untersuchung einbezogen werden. Mit Gefrierschnitten von formalinfixiertem Material können in angemessener Zeit ohne großen Aufwand sehr brauchbare Ergebnisse erzielt werden. Paraffinschnitte sind nur qualitativ besser, ihre Anfertigung dauert aber einen Tag länger. Als Färbung eignet sich besonders die Nissl-Färbung mit Cresylviolett, da hierbei in vielen Fällen auch die Erreger mikroskopisch nachgewiesen werden können. Zur Beurteilung der histopathologischen Veränderungen allein können jedoch auch andere gebräuchliche Färbungen verwendet werden.
2. Für die tägliche Diagnostik in Untersuchungsämtern muß wegen Entschädigungsleistungen möglichst rasch eine Entscheidung getroffen werden. Diese kann nach bisherigen Erfahrungen und nach den vorliegenden Unter-

suchungen nicht an den bakteriologischen Nachweis geknüpft werden, weil dieser in Einzelfällen versagt. Zudem besteht die Gefahr falschpositiver Ergebnisse, weil offensichtlich im Schlachtbereich die ubiquitär vorkommenden Listerien weit verbreitet sind. Der histologische Nachweis der typischen histologischen Veränderungen bietet ausreichende Sicherheit. Wenn dieser gründlich durchgeführt wird, ist das Risiko, daß positive Fälle unerkannt bleiben, oder negative Fälle als positiv angesprochen werden, gering. Trotzdem sollte zusammen mit der histologischen Untersuchung eine bakteriologische Anzüchtung der Keime versucht werden. Die beschriebene Methode erfaßt bereits im direkten Ausstrich mazerierten Hirngewebes über 50 % der positiven Fälle, so daß bei positivem Ergebnis schon etwa nach zwei bis drei Tagen eine positive Aussage gemacht werden kann. Dies wäre im Vergleich zu üblichen Anzüchtungsmethoden ein großer Zeitgewinn. Wenn es die Zeit im Einzelfall gestattet, ist die zusätzliche Kälteanreicherung als Erweiterung der bakteriologischen Untersuchung angebracht.

Als Untersuchungsmaterial sollte Gewebe vom Rautenhirn, wenn möglich auch aus der Medulla oblongata, entnommen werden. Ist das Gehirn unvollständig vorhanden, so ist zumindest Material aus dem Hirnstamm-bereich zu untersuchen. Die Proben müssen vor dem Anlegen auf der Oberfläche abgeflammt werden, um Kontaminationen auszuschließen.

3. Verläuft die direkte bakteriologische Untersuchung trotz positivem histologischem Ergebnis negativ oder erscheinen histopathologische Befunde nicht eindeutig, sollten die Gehirne einer immunhistologischen Untersuchung unterzogen werden. Dafür sind Paraffinschnitte

in Verbindung mit Peroxidase-Antiperoxidase-Technik und Avidin-Biotin-Technik am geeignetsten. Beide bieten gleichermaßen eine relativ hohe diagnostische Sicherheit, wobei jedoch letztere spezifischer ist und die Reagenzien weniger toxisch sind. Unter Berücksichtigung des Infektionsrisikos für das Personal durch unfixiertes Material und der geringeren Ausbeute als bei Paraffinschnitten ist diese Methode an Kryostatenschnitten als Ergänzungsuntersuchung kaum zu empfehlen. Für die Routine bieten immunohistochemische Untersuchungsverfahren keine wesentlichen Vorteile, da die Durchführung zu aufwendig ist.

- 4. Selbstverständlich sind klinische und anamnestische Befunde bei einer Diagnosestellung zu berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

Von 215 Hirnen verschiedener Hauswiederkäuer mit zentralnervösen Störungen (183 Rinder, 29 Schafe, 3 Ziegen) zeigten 74 (56 Rinder, 15 Schafe, 3 Ziegen) histologisch eine Hirnstammencephalitis vom Listeriosetyp. Die klinischen und histopathologischen Befunde entsprachen weitgehend den aus der Literatur bekannten Angaben. In 50 % der Fälle konnten mittels Nissl-Färbung mikroskopisch stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Beobachtungen lag zwischen den Monaten März und Juni. 53 Tiere (85,5 %) waren mit Silage gefüttert worden, 9 Tiere hatten vor der Erkrankung kein Silierfutter erhalten. Häufig waren noch Fehler bei der Silagebereitung, -aufbewahrung und -fütterung zu ermitteln.

In 78 % der histologisch positiven Tiere wurde *L. monocytogenes* bakteriologisch nachgewiesen; davon bei 56 % direkt und bei 44 % erst nach Kälteanreicherung. Daneben konnte auch *L. innocua* aus 3 histologisch positiven und aus 10 histologisch negativen Gehirnen angezüchtet werden.

Bei den angewandten immunhistologischen Methoden brachten Abklatschpräparate und Gefrierschnitte von formalinfixiertem Material keine brauchbaren Ergebnisse. An Kryostatschnitten lieferte nach Verbesserung der immunhistochemischen Methode die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik gute Resultate, an Paraffinschnitten erwies sich die ABC-Peroxidase-Technik am geeignetsten.

Insgesamt erscheinen diese Methoden für die Routine-diagnose jedoch wenig vorteilhaft. Am besten geeignet ist der histologische Nachweis der typischen entzündlichen Veränderungen. Der bakteriologische Nachweis bringt zwar zusätzliche Sicherheit, kann aber bei negativem Ausfall und positivem histologischem Befund nicht entscheidend sein und bei gleichzeitig histologisch negativem Befund wegen des ubiquitären Vorkommens der Erreger auch falsch-positiv ausfallen.

Summary

The diagnosis of listeric encephalitis in domestic ruminants with bacteriological, histological and immunohistochemical methods.

Out of brains of 215 domestic ruminants (183 cattle, 24 sheep, 3 goats) submitted with the clinical report central nervous symptoms 74 cases (56 cattle, 15 sheep, 3 goats) revealed histologically brain stem encephalitis of the listeriosis type. The clinical and histopathological findings were mostly in accordance with the reports described in literature. In 50 % of the cases rod-shaped bacteria could be observed in Nissl stained sections. The majority of cases occurred between the months March and June. 53 animals had been fed silage, 9 animals had not received silage before onset of the disease. Generally mistakes in preparation and storage of the silage as well as in feeding technique were to be ascertain.

In 78 % of the histologically positive animals also the bacteriologic isolation of *L. monocytogenes* was possible; in approximately 56 % of them directly, in 44 % after kryoenrichment. Additionally *L. innocua* was isolated from 3 histologically positive and from 10 histologically negative brains.

The employed immunohistological methods based on fresh smears and frozen sections of formalin-fixed tissue did not reveal satisfactory results. In cryostat sections the Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-technique yielded useful results after improvement of the staining technique; in paraffin sections the ABC-Peroxidase-technique turned out to be most suited. However, in sense of practicabili-

ty these methods seems to be of little advantage. The most suitable diagnostic approach seems to be the histological demonstration of the characteristic inflammatory alterations of the brain stem. Bacteriology offers certainly additional security, however it can also turn out false positiv, if its result is positiv and the histological status negativ because of the ubiquitous occurence of the bacteria.

6. Immunhistologische Abbildungen

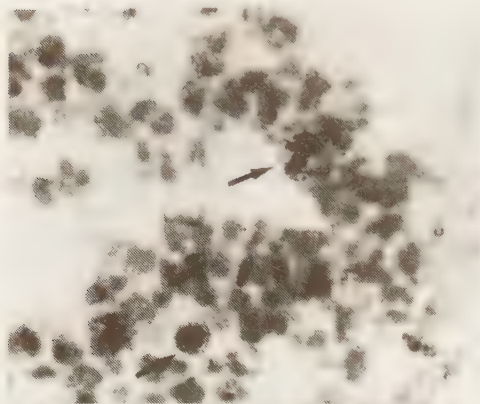


Abb. 5:

Deutliches intrazellulär
phagozytisiertes stäbchen-
förmiges Listerienantigen
Gehirn, Schaf, L. monocy-
togenes-PAP-Reaktion, Kry-
ostatschnitt,
x 400

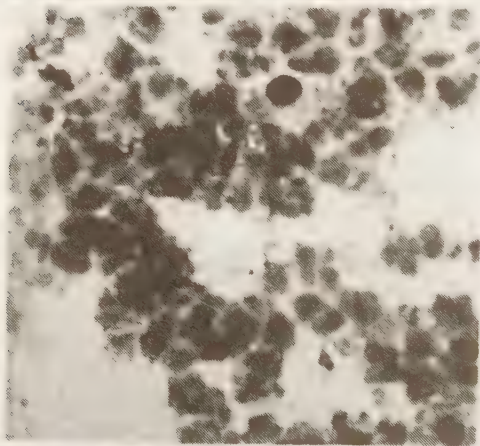


Abb. 6:

Granuläre intra- und extra-
zelluläre Antigen-Reaktionen
Gehirn, Schaf, L. monocy-
togenes-PAP-Reaktion, Kryostat-
schnitt, x 400

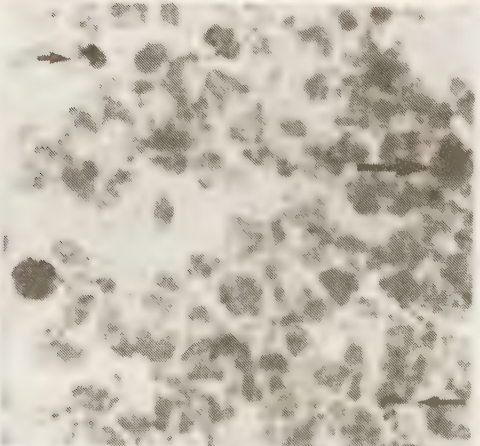


Abb. 7:

Granuläre intrazytoplasma-
tische Antigen-Reaktionen
und extrazellulär liegende
Listerienstäbchen
Gehirn, Schaf, L. monocy-
togenes-PAP-Reaktion, Kryostat-
schnitt, x 400

Abb. 8:

Stäbchenförmige und diffuse intrazelluläre Listerienantigene,
Gehirn, Rind, *L. monocytogenes*-ABC-Peroxidase-Reaktion,
Paraffinschnitt, x 600

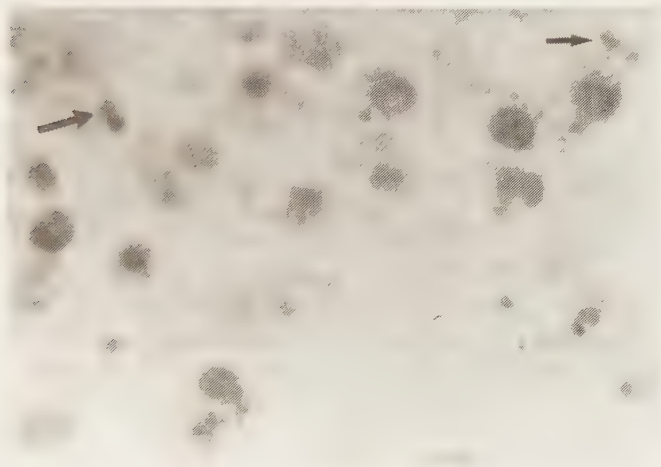
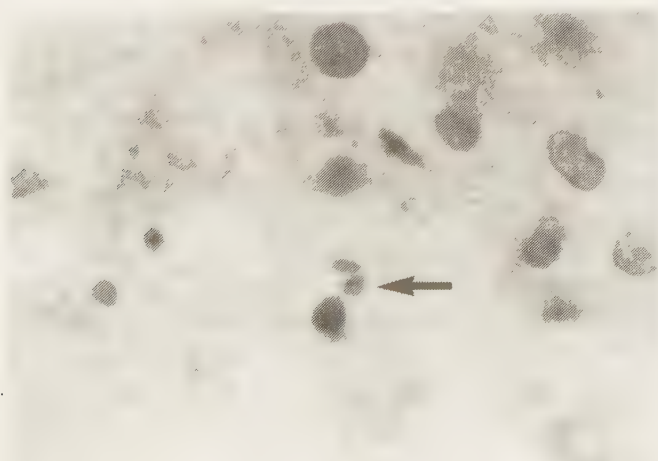


Abb. 9:

Intrazelluläre Antigenreaktionen von *L. monocytogenes*,
Gehirn, Rind, *L. monocytogenes*-ABC-Peroxidase-Reaktion,
Paraffinschnitt, x 600



Literaturverzeichnis

AA, R., VON DER:

Die Bedeutung der serologischen Diagnose für
die Erkennung und Bekämpfung der Listeriose.
Arch. Exp. Vet. Med. 15, 889 - 904 (1961).

derselbe:

Zur Listeriose bei Tier und Mensch.
Mh. Vet. Med. 18, 133 - 137 (1963).

AGANOVIC, N. und FORSEK, Z.:

Die Wachstumsdynamik von *L. monocytogenes* und
einiger Pilze in Silagemedien (Serbokroat.).
Veterinaria (Sarajevo) 18, 459 - 466 (1969).

ANONYM:

Listeria infections in farm animals.
Vet. Rec. 112, 314 (1983).

ANONYM:

Listeriosis outbreak associated with Mexican-style
cheese, California.
J. Food Prot. 48, 730 (1985).

AMTLICHE SAMMLUNG § 35 LMBG:

Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30° C in
Fleisch und Fleischerzeugnissen;
Tropfplatten-Verfahren (nach DIN 10161 Teil 2)
L. 06.00-19
Hrg. Bundesgesundheitsamt, BEUTH Verlag, Berlin (1987).

AMTSBERG, G.:

Epidemiologie und Diagnostik der Listeriose.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 86, 253 - 257, 295 - 299 (1979).

derselbe:

Listeriose.
In: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.
Hrsgb.: BLOBEL, H., SCHLIESSER, TH., Bd. II,
Fischer, Jena (1980).

ASAHI, O., HOSODA, T. und AKIYAMA, Y.:

Studies on the mechanism of infection of the brain
with *Listeria monocytogenes*.

Am. J. Vet. Res. 18, 147 - 157 (1957).

BARLOW, R. M. und MC GORUM, B.:

Ovine listerial encephalitis: Analysis, hypothesis
and synthesis.

Vet. Rec. 116, 233 - 236 (1985).

BEHRENS, H. und KRÜGER, A.:

Differenzierung der bei der Gehirnlisteriose der
Schafe isolierten *Listerien*stämme.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 82, 4 - 6 (1969).

BELLER, K. und ZELLER, M.:

Ist das bösartige Katarrhalfieber eine *Listeria*-
infektion?

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 64, 193 - 196 (1951).

BIEGELEISEN, J.:

Immunofluorescence techniques in retrospective
diagnosis of human listeriosis.

J. Bacteriol. 87, 1257 - 1258 (1964).

BILLE, J. und GLAUSER, M. P.:

Zur Listeriose-Situation in der Schweiz.

Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen 3,
28 (1988).

BIENFET, V., LOMBA, F. und BINOT, H.:

Une affection en recrudescence ou trop souvent
méconnue? L'encéphalite bovine à *Listeria monocytogenes*.

Ann. Méd. Vét. Bruxelles 113, 345 - 357
(1969).

(Die Listerien-Enzephalitis beim Rind - eine an Häufigkeit zunehmende oder zu oft unerkannt bleibende Krankheit?)

Ann. Méd. Vét. 113, 345 - 357 (1969).

BLENDEN, D. C. und SZATALOWICZ, F. I.:

Ecologic aspects of listeriosis.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 151, 1761 - 1766 (1967).

BOURNE, J. A.:

Handbook of immunoperoxidase staining methods.

Santa Barbara, CA, DAKO CORPORATION, (1983).

BRÄUER, P.:

Die Listeriose des Rindes (Schrifttumsübersicht).

Vet.-Med. Diss., Hannover (1966).

BÜNING, U.:

Auswertung der im Tiergesundheitsamt der Landwirtschaftskammer Hannover bei Schafen diagnostizierten Listeriosefälle.

Vet.-Med. Diss., Hannover (1975).

BUXTON, D., REID, H. W., FINLAYSON, J. und POW, J.:

Pathogenesis of "sheep associated" malignant catarrhal fever in rabbits.

Res. Vet. Sci. 36, 205 (1984).

CHALIMBEKOV, M. M.:

Bazillenträger und ihre epizootologische Bedeutung bei der Listerellose der Schafe (Russ.).

Veterinarija (Moskva) 34, 17 (1957).

Abst. in Vet. Bull., Weybridge 28, 670 (1958)

zit. n. JONES, S. M. und WOODBINE, M.

Microbiological aspects of *Listeria monocytogenes* with special reference to listeriosis in animals.

Vet. Rev. Annot. 7, 59 - 68 (1961).

CHARLTON, K. M.:

Spontaneous listeric encephalitis in sheep.
Electron microscopic studies.
Vet. Pathol. 14, 429 - 434 (1977).

CHARLTON, K. M. und GARCIA, M. M.:

Spontaneous Listeric Encephalitis and Neuritis
in sheep. Light microscopic studies.
Vet. Pathol. 14, 297 - 313 (1977).

CORDY, D. R. und OSBOLD, J. W.:

The meningopathogenesis of listeria encephalo-
myelitis in sheep and mice.
J. Infect. Dis. 104, 164 - 173 (1959).

DAHME, E.:

Persönliche Mitteilung (1988).

DAHME, E. und WILSC, E.:

Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie
der Haustiere.
4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart (1988).

DEDEK, J.:

Listeriennachweis bei der bakteriologischen
Fleischuntersuchung.
Mh. Vet.-Med. 22, 632 - 634 (1967).

DEDIE, K.:

Beitrag zur Epizootologie der Listeriose.
Arch. Exper. Vet. med. 9, 251 - 264 (1955).

DEDIE, K. und BOSTEDT, H.:

Schafkrankheiten.
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1985).

DIJKSTRA, R. G.:

Een studie over Listeriosis by runderen.
Vet.-Med. Diss., Utrecht (1965).

derselbe:

Listeriosis in animals: clinical signs, diagnosis and treatment.

in: Listeriosis. Joint WHO ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West).

10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 68 - 76 (1987).

DOMINGO, M., RAMOS, J. A., DOMINGUEZ, L., FERRER, L. und MARCO, A.:

Demonstration of Listeria Monocytogenes with the PAP Technique in Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissues of Experimentally Infected Mice.

J. Vet. Med. B. 33, 537 - 542 (1986).

DONNELLY, C. W.:

Isolation of the agent.

in: Listeriosis. Joint WHO ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West),

10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 122 - 133 (1987).

DUCASTELLE, R., COUSSEMENT, W., HOORENS, J.:

Demonstration of Canine Distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody-enzyme method.

Am. J. Vet. Res. 41, 1860 - 1862 (1980).

dieselben:

Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs.

Res. Vet. Sci. 32, 294 - 302 (1982).

EL GABBAR MOHAMMED, H.:

Untersuchungen über das Vorkommen von Listeria monocytogenes in Silagen sowie in Nasentupfern und Kotproben von Rindern.

Vet.-Med. Diss., Hannover (1969).

EMMERLING, P., SCHRÜTER, G. und HOF, H.:

Listeriose.

Infektion und Infektabwehr, Verlag

Schattauer, Stuttgart-New York, 32 - 41 (1986).

FELAND, W. G.:

Demonstration of *Listeria monocytogenes* in direct examination of spinal fluid by fluorescent-antibody technique.

J. Bacteriol. 85, 1448 - 1450 (1963).

FÄTZER, P. und GIECK, F.:

Histologische Differentialdiagnose bei tollwutverdächtigen Rindern.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 116, 347 - 356 (1974).

FENSTERBANK, R., AUDURIER, A., GODU, J., GUERRAULT, P. und MALO, N.:

Etude des souches de *Listeria* isolées d'animaux malades et de l'ensilage consommé.

Ann. Rech. Vét. 15, 113 - 118 (1984).

FETEANU, A., DARIE, P. und JORGULESCU, P.:

Identifizierung und Typisierung von *Listeria monocytogenes* mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern (1969).

Probleme der Listeriose, hrsgb. v. LIEBE, S. und DEGEN, R., Symp. Leipzig, 1968.

Thieme, Leipzig 1969, 79 - 85.

FLAMM, H.:

Eine "moderne" Zoonose: die Listeriose.

Sammelreferat.

Dtsch. Tierärztl. Wochn. 64, 190 - 193 (1957).

FLEMING, D. W., COCHI, S. L., MAC DONALD, K. L. et al.:

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.

New Engl. J. Med. 312, 404 - 407 (1985).

FRAPPIER, C. L., BECKER, M. E. und KENNETH, K. K.:

Listeriosis in animals submitted for rabies
diagnosis.

Proc. 3rd Int. Symp. on Listeriosis, Bilthoven,
259 - 263 (1966).

GALL, CH.:

Listeriose in einer Ziegenherde.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 75, 365 - 367 (1962).

GATES, G. A., BLENDE, D. C. und KINTNER, L. D.:

Listeric myelitis in sheep.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 150, 200 - 204 (1967).

GILL, D. A.:

Circling disease of sheep in New Zealand.

Vet. J. 87, 60 - 74 (1931).

GILHER, M.:

Listeriosis in Farm Animals in Great Britain.

In: Isolation and Identification of Micro-organisms
of Medical and Veterinary Importance.

London, UK; Academic Press 191 - 200 (1985)

En, 15 ref.; Society for Applied Bacteriology
Techn. Series No. 21.

GLEDEL, J.:

Epidemiology and significance of Listeriosis in
France.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on
Prevention and Control, Berlin (West),
10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 9 - 20 (1987).

GOMEZ-MAPASO, E.:

Listeriosis humana en Espana.

XI. Congreso Nacional De Microbiologia:

Sociedad Espanola DE Microbiologia.

Microbiologia-87, 2, 357 - 360 (1987).

GRAY, M. L. und KILLINGER, H.:

Listeria monocytogenes and Listeric Infections.
Bacteriol. Rev. 30, 309 - 382 (1966).

GROSS, F. und RIEBE, K.:

Gärfutter - Betriebswirtschaft, Erzeugung,
Verfütterung.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1974).

GROTTKER, S.:

Liquor-Untersuchungen bei der listerienbedingten
Meningoenzephalitis des Rindes.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 92, 257 - 259 (1985).

HADŽIMURATOVIĆ, M.:

Diagnostik der Listeriose bei Schafen durch das
Fluoreszenz-Antikörper-Verfahren (Serbokroat.).
Veterinaria (Sarajevo) 18, 99 - 110 (1969).

HARTWIGK, H. und RENK, W.:

Ein Fall einer spontanen Rinderlisteriose.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 69, 165 - 168 (1956).

HENRY, B. G.:

Dissociation in the genus *brucella*.
J. Infect. Dis. 52, 374 - 402 (1933).

HIRSCHL, A., ROTTER, M., KOHLER, W. und STANIK, G.:

Gehäuftes Auftreten von Neugeborenenlisteriose
in Wien.
Wiener klin. Wschr. 92, 44 - 47 (1980).

HOFMANN, W.:

Erkrankungen des Zentralnervensystems beim Rind.
2. Die Krankheiten jugendlicher und erwachsener
Rinder.
Tierärztl. Prax. 9, 23 - 42 (1981).

HOOD, M.:

Listeriosis: Louisiana 1954 - 1974

In: Problems of Listeriosis, ed. by WOODBINE, M.,
Leicester University Press (1975).

IWANOW, I.:

Untersuchungen über die Listeriose in Bulgarien.

Mh. Vet. Med. 17, 729 - 736 (1961).

JAKOB, W.:

Untersuchungen zum Infektionsmodus und zur Patho-
genese der Listeriose des Schafes.

Arch. Exp. Vet. Med. 17, 1081 - 1128 (1963).

derselbe:

Weitere experimentelle Untersuchungen zur Patho-
genese der zerebralen Listeriose des Schafes:

II. Mitteilung: Der Verlauf der experimentellen
Infektion mit *Listeria monocytogenes* unter ver-
schiedenartigen Streßbedingungen.

Arch. Exp. Vet. Med. 21, 679 - 684 (1967 a).

derselbe:

Weitere experimentelle Untersuchungen zur Patho-
genese der zerebralen Listeriose des Schafes:

III. Mitteilung: Der Verlauf der experimentellen
Infektion mit *L. monocytogenes* bei Schafen mit
Eiweißintensiv- und Eiweißmangelernährung.

Arch. Exp. Vet. Med. 21, 1061 - 1072 (1967 b).

JENSEN, R. und MACKEY, D. R.:

Listerellosis in cattle and sheep.

J. Am. Vet. Med. Ass. 114, 420 - 424 (1949).

JENZSCH, K. D.:

Klinik und Epizootologie der Listeriose.

Mh. Vet.-Med. 14, 443 - 446 (1959).

derselbe:

Listeriediagnostik bei der bakteriologischen
Fleischuntersuchung.

Mh. Vet.-Med. 15, 515 - 518 (1960).

- JONES, F. S. und LITTLE, R. B.:
Sporadic encephalitis in cows.
Arch. of Path. 18, 580 (1934).
- JONES, S. M. und WOODBINE, M.:
Microbiological aspects of *Listeria monocytogenes*
with special reference to listeriosis in animals.
Vet. Rev. Annot. 7, 39 - 68 (1961).
- JUBB, K. . . . und KENNEDY, P. C.:
Pathology of Domestic animals
2nd ed., Vol. 2, 405 - 410 (1970).
New York and London: Academic Press
- KALKOFF, K. W. und SCHIFF, W.:
Listeriose der Haut durch Kontaktinfektion.
Hautarzt 11, 201 (1960).
- KHAN, M. A., SEAMAN, A. und WOODBINE, M.:
Immunofluorescent Identification of *Listeria*
monocytogenes.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A239, 62 - 69 (1977).
- KING, L. S.:
Primary encephalomyelitis in goats associated
with *Listerella* infection.
J. Path. 16, 467 (1940).
- KNÖSEL, H., WINKENWERDER, W. und REDLICH, G.:
Spontane Gehirnlisteriose bei einem Rind.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 75, 289 - 292 (1968).
- KRÜGER, W.:
Das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in den
verschiedenen Silagen und dessen ätiologische
Bedeutung.
Arch. Exp. Vet. Med. 17, 181 - 203 (1963).

LEHNERT, H.:

Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose.

Arch. exp. Vet.-Med. 18, 981 - 1027 und 1247 - 1302 (1964).

LEVADITI, J. C., GUILLON, J. C. und GAMET, A.:

Fréquence et variations saisonnières de la listeriose cérébrale bovine observée en France au cours d'une enquête sur la rage.

Bull. Soc. Pathol. Exot. 68, 26 - 32 (1975).

LINSER, H.:

Beitrag zur serologischen Diagnose der Listeriose.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 69, 223 - 226 (1956).

derselbe:

Die Listeriose.

Mh. Vet. Med. 12, 4 - 9 (1957).

derselbe:

Beitrag zur Klinik der Tierlisteriose.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 66, 636 - 641 (1959).

LOW, C. und LINKLATER, K.:

Listeriosis in sheep.

Vet. Rec. supplement In Practice, 66 - 67 (1985).

MACLEOD, N. S. M. und WELLS, R.:

Isolation of *L. monocytogenes* from ovine brain.

Vet. Rec. supplement In Practice, 309 - 310 (1986).

MATTHEWS, F. P.:

Encephalitis in calves.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 73, 513 - 516 (1928).

MATTHIAS, D.:

Zur Pathologie und Pathogenese der Listeriose einiger Haustiere.

Arch. exp. Vet.-Med. 15, 905 - 919 (1961).

MANZ, D. und FÜRSTER, U.:

Beitrag zum Tierversuch in der Listeriendiagnostik.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 85, 2 - 4 (1972).

MAUPAS, P. H., BIND, J. C., CHIRON, J. P. und DARCHIS, J. P.:
Epidemiologic and pathogenic conception of animal and
human listeriosis.

Proc. 6th Intern. Symp. on Listeriosis Nottingham
1974, ed. by M. WOODBINE.
Leicester University Press, 221 - 224 (1975).

MAYER, H. und STENG, G.:

Die Listeriose der Schafe und das Problem der
Impfprophylaxe.
Prakt. Tierarzt 3, 149 - 152 (1975).

MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A. und SWANN, M. B. R.:

A disease of rabbits characterized by large mono-
nuclear leucocytosis, caused by a hitherto un-
described bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.).
J. Path. Bact. 29, 407 - 439 (1926).

NADJI, M. und MORALES, A. R.:

Immunoperoxidase: Part I. The technique and its
pitfalls.
Lab. Med. 14, 767 - 771 (1983).

NICOLAI-SCHOLTEN, M.-E., PÖTEL, J., NAIZSCHKA, J. und
PEKKER, ST.:

Vermehrtes Auftreten von Listeriose-Erkrankungen
in Niedersachsen, 1983.
Immun. Infekt. 13, 76 - 77 (1985).

OBIGER, G. und SCHÖNBERG, A.:

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen
Nährmedien zur bakteriologischen Diagnose der
Listeriose.
Fleischwirtsch. 10, 1452 - 1456 (1973).

OHMANN, H. B., JENSEN, M. H., SØRENSEN, K. J. und
DALSGAARD, K.:

Demonstration of bovine viral diarrhoea virus
antigen in cryostat- and paraffin- sections of
bovine tissues by the immunoperoxidase technique.
Acta path. microbiol. scand. Sect. C, 89, 281 - 285

OHSHIMA, K.-J., MIURA, S., NUMAKUNAI, S. und CHIHAYA, Y.:
A case of bovine cerebral listeriosis with ocular
lesion (Ein Fall von boviner Hirnlisteriose mit
Augenveränderung).
Jap. J. veter. Sci., Tokyo 36, 183 - 185 (1974).

OLAFSON, P.:

Listerella encephalitis (circling disease) of sheep,
cattle and goats.

Cornell Vet. 30, 141 - 150 (1940).

OVERAS, J.:

A comparison between hay fed and grass silage fed
sheep with special reference to serum iron, total
iron-binding capacity and transferrin saturation.
Nord. Vet. Med. 26, 545 - 555 (1974).

PALLASKE, G.:

Über das Vorkommen einer seuchenhaften Encephalo-
myelitis purulenta bei Schafen in Deutschland
(Listerella-Infektion).

Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 441 - 445 (1940).

derselbe:

Pathologische Histologie.

Gustav Fischer Verlag, Jena (1955).

derselbe:

Pathologische Anatomie der Listeriose, besonders
beim Tier.

Zbl. Vet.-Med.: Beiheft 1, 49 - 60 (1958).

PALMER, D. G., OSSENT, P., SUTER, M. M. und FERRARI, E.:
Demonstration of viral antigen in paraffin tissue
sections: comparison of the immunofluorescence
technique with the unlabeled antibody enzyme method.
Am. J. Vet. Res. 46, 283 - 286 (1985).

PAŤOCKA, F., MENCÍKOVÁ, E., SEELIGER, H. P. R. und
JIRASEK, A.:

Neurotropic activity of a strain of *Listeria*
innocua in suckling mice.

Neurotrope Aktivität eines Stammes von *Listeria*
innocua bei Saugmäusen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 490 - 498 (1979).

PITTMAN, B. und CHERRY, W. B.:

Isolation of *Listeria monocytogenes* from brains of
rabies-negative animals.

Am. J. Vet. Res. 28, 779 - 785 (1967).

PIRIE, J. H. H.:

A new disease of veld rodents. "Tiger River Disease".

Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. 3, 163 - 186 (1927).

derselbe:

Listeria: Change of name for a genus of bacteria.

Nature, London 145, 264 (1940).

POPPENSIEK, G. C.:

Listerellosis - a case report.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 105, 147 - 148 (1944).

POTEL, K.:

Die Bedeutung der Listeriose für unsere Tierbestände
und aktuelle Probleme der Listerioseforschung.

Mh. Vet. Med. 18, 3 - 8 (1963).

POTEL, J.:

Die Listeriose unter besonderer Berücksichtigung der
Epidemiologie.

Fleischwirtsch. 3, 301 - 306 (1968).

POTEL, K., SCHLEICHER, J., SCHNEIDER, J., GÜNTHER, H.
und KLAUS, G.:

Untersuchungen zur Pathogenese der Gehirnlisteriose
des Schafes.

Mh. Vet.-Med. 24, 575 - 579 (1969).

POTEL, J., BURKHARDT und MALOITKE:

Isolierung und Identifizierung von *Corynebacterium*,
Listeria und *Erysipelothrix*.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 253, 43 - 60 (1982).

RÁCZ, P., KAISERLING, E., TENNER, K. und WÜTHE, H. H.:

Experimental listeric cystitis. II. Further evidence
of epithelial phase in experimental infection.

An electronmicroscopic study.

Virchows Arch. Cell Pathol. 13, 24 - 37 (1973).

RÁCZ, P., TENNER, K. und KAISERLING, E.:

Epithelial phase in listeric infection.

Proc. 6th Int. Sympos. on Listeriosis, Nottingham
1974, ed. by WOODBINE, M., Leicester Univ. Press.

173 - 179 1975.

RAUVICH, R. A.:

Epidemiology and significance of Listeriosis
in the European Countries.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on
Prevention and Control, Berlin (West),
10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 21 - 55 (1987).

REBHUN, W. C. und DELAHUNTA, A.:

Diagnosis and treatment of bovine listeriosis.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 180, 395 - 398 (1982).

ROCOURT, J.:

Identification of *Listeria* isolates.

In: *Listeriosis*. Joint WHO/ROI Consultation on
Prevention and Control, Berlin (West),
10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 134 - 145 (1987).

ROCOURT, J., HOF, H., SCHRETTENBRUNNER, A., MALINVERNI, R.
und BILLE, J.:

Meningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri*
chez un adulte immunocompétent.

Schweiz. med. Wschr. 116, 248 - 251 (1986).

ROLLE, M. und MAYR, A.:

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und
Seuchenlehre.

5. Auflg., ENKE Verlag, Stuttgart (1984).

V. SANDERSLEBEN, J., DÄMMRICH, K. und DAHME, E.:

Pathologische Histologie der Haustiere.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1981).

SEELIGER, H. P. R.:

Listeriosis.

Karger, Basel-New York (1961).

derselbe:

Die ätiolog. Diagnose der Listeriose.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 187, 267 - 277 (1962).

derselbe:

Apathogene *Listerien*: *L. innocua* sp. n.

(SEELIGER et SCHÖNIG, 1977).

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 249, 487 - 493 (1981).

derselbe:

Listeriose-Meningoenzephalitis.

Bundesgesundheitsblatt 25, 222 - 224 (1982).

derselbe:

Listeriosis, some newer aspects.

Infect. Dis. Newsletter 3, 71 - 73 (1984).

derselbe:

Classification and pathogenicity of Listeria.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on
Prevention and Control, Berlin (West),
10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 56 - 62 (1987 a).

derselbe:

Diagnosis and treatment of Listeriosis.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on
Prevention and Control, Berlin (West),
10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 63 - 67 (1987 b).

derselbe:

Listeriose-aktuell.

Dtsch. med. Wschr. 112, 359 - 361 (1987 c).

SEELIGER, H. P. R. und EMMERLING, P.:

Epidemiologie, Klinik und Therapie der Listeriose.
Med. Klin. 65, 279 - 283 (1970).

SEELIGER, H. P. R. und HÖHNE, K.:

Serotyping of Listeria monocytogenes and related
species.

In: BERGAN, T., NORRIS, J. R. (ed.).

Methods in Microbiology 13, 31 - 49 (1979).

SIELAFF, H.:

Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose.
Mh. Vet.-Med. 21, 750 - 758 und 792 - 796 (1966).

SIPKA, M., STAINER, B. und ZAKULA, S.:

Nachweis von Listerien in der Milch.

Wien. tierärztl. Mschr. 60, 50 - 52 (1973).

SKOVGAARD, N.:

Listeria: major sources and routes of human infection, environment and plants.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West), 10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 86 - 97 (1987 a).

derselbe:

Listeria: food of animal origin.

In: Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West), 10 - 12 December 1986.

Vetmed-Hefte 5, 110 - 121 (1987 b).

SMITH, C. W., MARSHALL, J. D. und LVELAND, W. C.:

Identification of Listeria monocytogenes by the fluorescent antibody technic.

Proc. Soc. Exp. Med. 103, 842 - 845 (1960).

SMITH, C. W. und MEIZGER, J. F.:

Identification of Listeria monocytogenes in experimentally infected animal tissue by immunofluorescence.

Proc. 2nd Symposium on Listeric Infection 1962, ed. by M. L. GRAY, Montana State College, Bozeman, 179 - 182 (1963).

SMITH, R. E., REYNOLDS, I. M. und HARRIS, J. G.:

Experimental ovine listeriosis.

II. Immunofluorescent methods applied to maternal and fetal tissues.

Cornell Vet. 58, 389 - 398 (1968).

SWORD, C. P.:

Iron metabolism and experimental listeriosis.

Proc. 3rd. Int. Symp. on Listeriosis, Bilthoven, 19 - 21 (1966).

- SCHAAF, A., VAN DER, DE JONG, J. J. und DE JONG, J. M.:
Listeria monocytogenes als mogelikje verwekker van
een hersenaandoeing bij het rund.
(Listeria monocytogenes als Ursache von zentral-
nervösen Störungen beim Rind).
Tschr. diergeneesk. 77, 904 - 907 (1951).
- SCHÄFER, I.:
Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Wachs-
tumsprobe in der Serodiagnostik der Listeriose der
Tiere.
Vet.-Med. Diss., Hannover 1976 .
- SCHLECH, W. F., LAVIGNE, P.-M., BARTOLUSSI, R. A., et al.:
Epidemic listeriosis-evidence for transmission by
food.
New Engl. J. Med. 308, 203 - 206 (1983).
- SCHÖNBERG, A.:
Listeriosis in animal stocks in the Federal
Republic of Germany between 1980 - 1984 in
relation to foodborne outbreaks.
2nd World Congr. Foodborne Infections and
Intoxications, Proceedings 1, 224 - 229 (1986).
- SCHRETTENBRUNNER, A., ROCOURT, J. und SEELIGER, H. P. R.:
Die Listeriose des Zentralnervensystems.
Schwerpunktmed. 9, Heft 2, 5 - 8 (1986).
- SCHULTE, I. und SCHOLZ, H.-D.:
Listerienmeningitis bei Schafen, hervorgerufen durch
einen in Deutschland seltenen Listerientyp.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 63, 257 - 260 (1956).

STERNBERGER, L. A., HARDY, P. H., CUCUTIS, J. J. und MEYER, H. G.:

The unlabeled antibody enzyme method of immuno-histochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.

J. Histochem. Cytochem. 18, 315 - 333 (1970).

STÜBER, M.:

Differentialsymptomatologie einiger Krankheiten des zentralen Nervensystems des Rindes.

Vet.-Med. Nachr., Jahrg. 1984, 99 - 121 (1984);

Jahrg. 1985, 3 - 9 (1985).

TERPLAN, G., SCHOLN, R., SPRINGMEYER, W., DEGLE, I. und BECKER, H.:

Listeria monocytogenes in Milch und Milchprodukten.

Dtsch. Molkereizeitung 41, 1358 - 1368 (1986).

TRAIN, G.:

Ein Beitrag zur planmäßigen Bekämpfung der Listeriose.

Mh. Vet. Med. 14, 695 - 702 (1959).

TRAUTWEIN, G. und BEHRENS, H.:

Histopathologie der Meningoencephalitis

listeriosa des Schafes.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 149 - 155 (1962).

URBANECK, D.:

Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Laboratoriums- und Haustieren:

II. Mitteilung: Zur Pathogenese der Listeriose beim Meerschweinchen.

Arch. Exp. Vet. Med. 15, 557 - 595 (1961).

derselbe;

Zur Neuropathogenese der Listeriose. Histologische Untersuchungen am N. trigeminus bei spontan an zerebraler Form der Listeriose erkrankten Schafen. Arch. exp. Vet.-Med. 16, 61 - 80 (1962).

URBANECK, D. und LIPPMANN, R.:

Zur zerebralen Form der Listeriose der Schafe. Mh. Vet.-Med. 16, 659 - 665 (1961).

URBANECK, D. und RITTENBACH, P.:

Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren.

V. Mitteilung: Pathologische Veränderungen bei septikämischem Krankheitsverlauf der Listeriose bei Schafen.

Arch. exp. Vet.-Med. 17, 117 - 162 (1963).

URBANECK, D., LEHNERT, CH., RITTENBACH, P. und SCHLEICHER, J.:

Morphologische und bakteriologische Befunde bei der spontanen Gehirnlisteriose der Schafe.

Arch. exp. Vet.-Med. 17, 717 - 750 (1963).

URBANECK, D. und SCHLEICHER, J.:

Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren:

VI. Mitteilung: Zur Neuropathogenese der Listeriose bei Meerschweinchen.

Arch. Exp. Vet.-Med. 17, 1129 - 1159 (1963).

URBANECK, D., SCHLEICHER, J. und FUCHS, G.:

Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren.

IX. Mitteilung: Infektionsversuche an partiell neurektonierten Gehirnnerven bei Schafen.

Arch. exp. Vet.-Med. 20, 1 - 22 (1966).

VALLEE, A., GUILLON, J. C. LEVADITI, J. und
DESPIERRES, M.:

Aspect actuel de la listériose cérébrale bovine
en France.

Bull. Acad. Vét. Fr. 45, 277 - 282 (1972).

VARGAS PEIXOTO, DE, P. F.:

Vergleichende histopathologische und immunhisto-
logische Untersuchungen zur Diagnose spontaner
Listeriose bei Tieren.

Eine retrospektive Studie mit der Peroxidase-
Antiperoxidase- (PAP)-Technik an formalinfixierten
Paraffinschnitten.

Vet.-Med. Diss., Gießen (1986).

VERIES, J., DE und STIJNWERDA, R.:

Een geval van listeria-mastitis ("uier-listeriose")
bij het rund.

(Ein Fall klinischer Euterlisteriose beim Rind).

Tschr. diergeneesk. 81, 833 - 838 (1956).

Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 167, 229 - 232 (1957).

WACHENDÖRFER, G. und ZIRPEL, H.:

Zur Vorbeugung und Bekämpfung der Schaflisteriose.

Prakt. Tierarzt 57, 362 - 368 (1976).

WATKINS, J.:

Isolation of *Listeria monocytogenes*.

In Isolation and Identification of Micro-Organisms
of Medical and Veterinary Importance.

London, UK; Academic Press 201 - 206 (1985).

En, 12 ref.; Society for Applied Bacteriology

Technical Series No. 21.

WEIS, J.:

Listeriose und Silagefütterung beim Schaf.

Tierärztl. Umsch. 20, 72 - 74 (1965).

derselbe:

Ein Beitrag zur Listeriose des Rindes.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 109, 122 - 129 (1967).

derselbe:

Beobachtungen über Listeriose bei unseren nutzbaren Haustieren.

Tierärztl. Umsch. 28, 652 - 654 (1973).

derselbe:

The incidence of *Listeria monocytogenes* on plants and in soil.

Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, Nottingham 1974 ed. by M. WOODBINE, Leicester University Press, 61 - 66 (1975 a).

derselbe:

The incidence of *Listeria monocytogenes* in domestic and wild animals in South-West Germany.

Proc. 6th Int. Symp. on Listeriosis, Nottingham 1974 ed. by M. WOODBINE, Leicester University Press, 121 - 126 (1975 b).

WEIS, J. und SEELIGER, H. P. R.:

Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature.

Appl. Microbiol. 30, 29 - 32 (1975).

WEST, H. J. und OBWOLO, M.:

Bilateral facial paralysis in a cow with listeriosis.

Vet. Rec. 120, 204 - 205 (1987).

WINKENWERDER, W.:

Das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* bei Rindern in Niedersachsen.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 445 - 449 (1967).

WINKENWERDER, W. und ABDALLAH, I. S.:

Das Vorkommen komplementbindender Listerienantikörper im Serum von Rindern.

Tierärztl. Umsch. 22, 179 - 184 (1967).

WRAMBY, G. O.:

Om *Listerella monocytogenes* bakteriologi och om
förekomst är listerellainfektion hos djur.
(*Listeria monocytogenes* und ihr Vorkommen bei
Tieren).

Skand. vet. tskr. 34, 277 - 290 (1944).

WUILLERET, A., DESPRÉS, P., MONTEIRO, L., BOUZAKOURA, C.
und WILDI, E.:

Contribution à l'étude du diagnostic bactériologique
et histologique de la listériose à l'occasion d'une
enzootie ovine.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 111, 622 - 641 (1969).

Lebenslauf

Robert Gayer

06.10.1960

geboren in Riedlingen, Krs. Biberach,
als Sohn der Eheleute Konrad und
Augusta Gayer, geb. Weber.

Ausbildungsgang:

1967 - 1971

Grundschule Altshausen

1971 - 1977

Progymnasium des Missionshauses
St. Johann, Aulendorf 1

1977 - 1980

Kreisgymnasium Riedlingen

1980 - 1981

Zivildienst im Missionshaus St. Johann,
Aulendorf 1

WS 1981/82 -

WS 1986/87

Studium der Tiermedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

12. November 1986

Tierärztliches Staatsexamen

Januar 1987

Approbation

Seit Dezember 1986

Arbeit an vorliegender Dissertation
am Staatlichen Tierärztlichen Unter-
suchungsamt Aulendorf

Herrn Prof. Dr. E. Dahme möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Unterstützung herzlichst danken.

Herrn Ltd. Reg. Vet. Dir. Dr. B. Müller, Leiter des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, danke ich besonders für die wertvollen Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit und für die großzügige Bereitstellung aller notwendigen Einrichtungen des Untersuchungsamtes.

Den Mitarbeitern der pathologischen Abteilung des Untersuchungsamtes Aulendorf, insbesondere Herrn Dr. J. Rapp und Herrn Dr. B. Gylstorff, danke ich herzlich für die zahlreichen Hilfeleistungen bei der Erstellung dieser Arbeit und für die Anleitung in der Methode.

Herrn Dr. M. Sabolić möchte ich für die hilfreiche Unterstützung bei der bakteriologischen Untersuchung meinen Dank aussprechen.

Frau Dr. A. Hafner, München, danke ich vielmals für die freundliche Vermittlung von Probenmaterial und für die Anfertigung von photographischen Arbeiten.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. P. R. Seeliger, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, für die Bestätigung und Serotypisierung der isolierten Listerienstämme.

Allen Mitarbeitern am Untersuchungsamt Aulendorf bin ich für ihre immer freundliche und geduldige Hilfe bei den umfangreichen Versuchsdurchführungen zu großem Dank verpflichtet.

